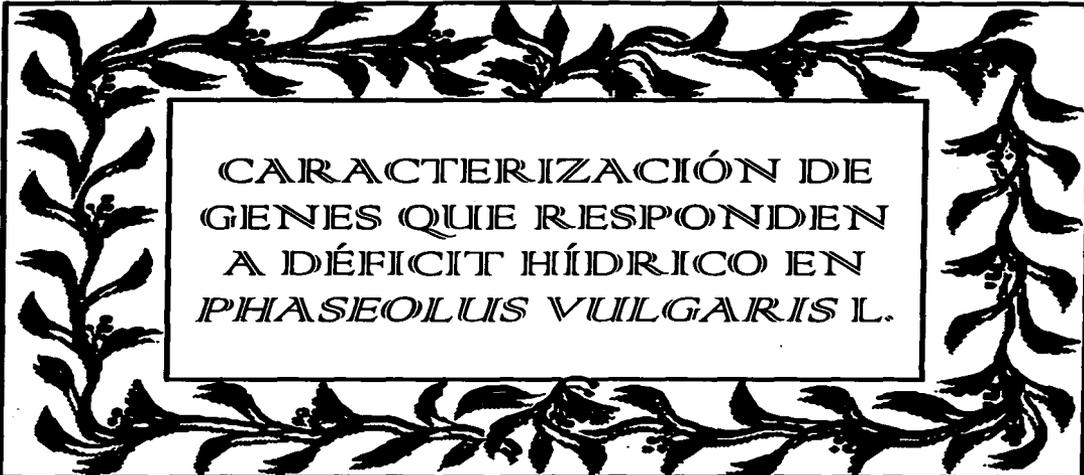


C. C. H.

03088

3  
24



CARACTERIZACIÓN DE  
GENES QUE RESPONDEN  
A DÉFICIT HÍDRICO EN  
*PHASEOLUS VULGARIS* L.

TESIS QUE PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO  
DE DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA PRESENTA  
JOSÉ MANUEL COLMENERO FLORES

INSTITUTO DE  
BIOTECNOLOGÍA (UNAM)

CUERNAVACA, MORELOS  
SEPTIEMBRE DE 1997

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**PAGINACION VARIA**

**COMPLETA LA INFORMACION**

# CARACTERIZACIÓN DE GENES QUE RESPONDEN A DÉFICIT HÍDRICO EN *Phaseolus vulgaris* L

RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LA TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA PRESENTA EL LIC. EN BIOLOGÍA  
JOSÉ MANUEL COLMENERO FLORES

A lo largo de todo este trabajo hemos descrito la caracterización de un grupo de genes de *P. vulgaris* que responden a déficit hídrico. De ellos, tres genes codifican para proteínas que son secretadas a la pared celular: dos proteínas ricas en prolina (PvPRP-12 y PvPRP2-37) y una transferasa de lípidos (PvLTP-24), cuyas funciones precisas en la adaptación de los tejidos vegetales a la deshidratación no han sido aún establecidas. Sin embargo, los conocimientos acumulados sobre la naturaleza de dichas proteínas y su comportamiento durante el desarrollo de las plantas o su respuesta a factores medioambientales nos ha permitido sugerir que participan en modificaciones de la pared celular encaminadas a aumentar su resistencia mecánica, su resistencia frente a la penetración de patógenos y su resistencia frente a la pérdida de agua. En el caso de las PRPs, su papel adaptativo frente al déficit hídrico está mucho menos explorado que el de las LTPs, por lo que en el laboratorio se ha continuado su caracterización en colaboración con la Dra Gladys Casaab, con quien se está analizando las variaciones en cantidad y en solubilidad de las PRPs durante el estrés. Otro foco de interés tradicional en el laboratorio que ha redirigido nuestra atención a las PRPs es su posible participación en el proceso de transducción de información celular a través de los mecanismos de anejección entre la pared celular y la membrana plasmática. Recientemente se ha encontrado que una proteína de pared celular de *P. vulgaris* caracterizada en el laboratorio, que se acumula en respuesta a déficit hídrico y que promueve procesos de adhesión celular *in vitro*, cruza antígenicamente con un anticuerpo que reconoce a la familia PRP2 de plantas, y cuyo representante en frijol es el producto del gen PvPRP2-37.

Los otros genes, cuya expresión ha sido descrita en esta tesis, codifican para proteínas que han sido implicadas en la estabilización de proteínas y estructuras celulares durante el estrés. Se trata de la proteína de choque térmico de bajo peso molecular (PvHSP17-19) y de las proteínas de embriogénesis tardía (PvLEAIV-25 y PvLEA-18). Tampoco en estos casos se conoce el modo de acción de las proteínas o las funciones que realizan para aumentar la tolerancia de la célula vegetal a la deshidratación. Para el caso de las lmw-HSPs, la evidencia obtenida *in-vitro* e *in-vivo* sugieren que esta familia de proteínas funciona en las células eucariotas como surfactantes y

estabilizadores de proteínas y que esta podría ser al menos una de sus funciones adaptativas en condiciones de baja disponibilidad de agua. La mayor parte de nuestro interés se ha enfocado en uno de los grupos de proteínas de plantas que quizás ha sido más citado en la bibliografía, pero que, al mismo tiempo sigue siendo el gran desconocido de la respuesta a estrés osmótico en las plantas: las proteínas LEA. Aparte de un miembro de una familia conocida de LEAs, hemos descrito la expresión de un gen que hemos podido clasificar como componente de una nueva familia de genes *lea* de plantas: *Pvlea-18*. Además de describir su respuesta al déficit hídrico, hemos encontrado que juega un papel en tejidos vegetales de plántulas no sometidas a estrés medioambiental. La presencia en estos tejidos está relacionada con una alta acumulación de osmolitos, ya sea por su involucramiento en procesos de expansión celular o en procesos metabólicos. La proteína se asegura su presencia en dichos tejidos a través de la activación del gen en la región de elongación del hipocotilo y a través de un mecanismo de regulación postranscripcional que probablemente determina un incremento de su estabilidad. Pensamos que esto está relacionado con una interacción estable de PvLEA-18 con carbohidratos solubles, según se deriva de resultados recientes obtenidos en el laboratorio. Estamos interesados en completar esta caracterización y en probar las propiedades protectoras *in-vitro* de PvLEA-18 sobre la estabilidad de enzimas en ambientes de baja disponibilidad de agua.

Finalmente hemos podido establecer que la acumulación de proteínas muy hidrofílicas ricas en glicinas en procesos de aclimatación al estrés osmótico es un mecanismo adaptativo que ocurre en una diversidad de organismos muy distanciados filogenéticamente, y a las proteínas que cumplen estas propiedades las hemos llamado hidrofílicas. Por ahora desconocemos la función de este tipo de proteínas, aunque pensamos que cumplen funciones variadas relacionadas con la estabilización de proteínas y estructuras celulares así como con la protección de ácidos nucleicos. La identificación de este tipo de proteínas fuera de las plantas abre un campo de investigación con muchos abordajes, aunque nuestro principal interés se centra en demostrar que juegan un papel adaptativo en ambientes con baja disponibilidad de agua y en aproximarnos a sus funciones de manera más precisa.



BIOL. JOSÉ M. COLMENERO FLORES



DRA. ALEJANDRA A. COVARRUBIAS ROBLES  
TUTORA DE LA TESIS

# CHARACTERIZATION OF GENES FROM *Phaseolus vulgaris* THAT RESPOND TO WATER DEFICIT

ABSTRACT OF THE Ph.D. THESIS BY JOSÉ MANUEL COLMENERO FLORES

Six cDNA clones from *Phaseolus vulgaris*, whose expression is induced by water deficit and ABA treatments (rsP cDNAs) were identified and characterized. The sequence analyses of the isolated clones suggest that they encode two types of late-embryogenesis abundant (LEA) proteins, a class-1 cytoplasmic low molecular weight-heat shock protein (lmw-HSP), a lipid transfer protein (LTP), and two different proline-rich proteins (PRP). One of the putative LEA proteins identified corresponds to a novel 9.3 kD atypical LEA protein. During the plant response to mild water deficit ( $Y_w = -0.35$  MPa) all these genes present a maximum expression at around 16 or 24h of treatment, after which it starts to decrease. Rehydration experiments revealed that those genes encoding PRPs and LTP transiently re-induce or maintain their expression when water is added to the soil after a dehydration period. This is not the case for the *lea* genes whose transcripts rapidly decrease until they reach their basal levels a few hours after rehydration (4h). Under water deficit and ABA treatments, the highest levels of expression for most of the genes occur in the root, except for the *ltp* gene whose maximum expression levels are found in the aerial regions of the plant. This indicates that for these genes, both, water deficit and ABA dependent expression is under an organ (root, stem and leaf) specific control. The data presented here support the importance of these proteins during the plant response to water deficit.

We have also studied the expression of these genes in the different growing regions of the hypocotyl from well watered and water stressed bean seedlings. We determined that water deficit elicits transcript accumulation of most genes (both *Pvlea* genes, *Pvltp-24* and both *Pvprp* genes) in the hypocotyl region that verifies loss of turgor under stress conditions. Interestingly, the *Pvhsp17-19* gene responds to water deficit in a stronger manner in the dividing region of the hypocotyl, suggesting a different protective role of lmw-HSP proteins compared to those that are specifically accumulated in those tissues damaged as consequence of turgor loss. Additionally, we also noticed the participation of *Pvlea-18* in the growing tissues of well watered seedlings.

*Pvlea-18* is a novel stress gene that encodes for a polypeptide with structural properties similar to those present in LEA proteins. The *Pvlea-18* transcript is present in the dry embryo and the endosperm from *Phaseolus vulgaris* seeds, and it is accumulated in vegetative tissues in response to water

deficit and ABA application [Colmenero-Flores et al, 1997]. In this work we have purified antibodies against the product of this gene, expressed in *E. coli*, and showed that it codifies for a protein with an apparent molecular mass of 14 kDa. These antibodies recognize related proteins in *Arabidopsis thaliana* as well as in maize seeds indicating that PvLEA-18 is a member of a new family of LEA proteins. The corresponding gene in *Arabidopsis* has been detected by searching homologous sequences in the *Arabidopsis* genome sequence data bank. Additionally, we show that the *Pvlea-18* gene encodes a true LEA protein since its product starts to accumulate during late embryogenesis. The characterization of the PvLEA-18 transcript and protein accumulation patterns show that they not only accumulate in different organs of the bean seedlings during water deficit treatment, but also in the growing region of hypocotyls from well irrigated seedlings. The PvLEA-18 protein showed its highest accumulation in the most apical regions, progressively decreasing towards the basal mature region either in well-irrigated as in stressed plants. This accumulation pattern correlates with the reduction in water and osmotic potential values along the bean seedling hypocotyl. Immunohistochemical localization experiments showed that PvLEA-18 is present in the nucleus and cytoplasm of all the cell types from the hypocotyl growing regions, undergoing a strong reduction in the cortex and pith from the hypocotyl mature zone. A similar localization but in a higher abundance was found in the different regions of water stressed seedlings. We propose that PvLEA-18 plays a protective role in those tissues where water potential is developmentally or ambientally driven to more negative values.

Finally, we have established the participation of highly hydrophilic proteins during adaptation to water deficit of organisms different to plants. These proteins are structurally similar to LEA proteins from plants, that are accumulated in dry seeds and vegetative tissues subjected to water deficit treatments. We have called hydrophilins to these type of proteins.



BIOL. JOSÉ M. COLMENERO FLORES



DRA. ALEJANDRA A. COVARRUBIAS ROBLES  
TUTORA DE LA TESIS

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

El estrés se define usualmente como aquel factor externo que ejerce un efecto desventajoso en un sistema. En el caso de las plantas, se mide por sus efectos en el crecimiento (acumulación de biomasa) o en procesos primarios de asimilación, como la fijación de CO<sub>2</sub> o la captación de minerales [Taiz, 1991, Cap. 14]. Las plantas en vida natural o aquéllas crecidas en procesos agrícolas están constantemente sometidas a múltiples formas de estrés como la sequía, la salinidad, la carencia de nutrientes minerales, las variaciones extremas de temperatura y de pH, la presencia de metales pesados, etc, lo que limita considerablemente su potencial de desarrollo. Según Dudal (1976), tan sólo el 10% de los terrenos de cultivo en todo el mundo no están claramente afectados por estos tipos de estrés abiótico. Se estima también que por estas causas los cultivos en EEUU se desarrollan al 22% de su potencial genético [Boyer, 1982]. El déficit hídrico o estrés osmótico ocurre en las plantas cuando la tasa de transpiración excede a la toma de agua. Esto no sólo sucede cuando hay poca agua en el ambiente, sino también por las bajas temperaturas y por una elevada salinidad del suelo. La tercera parte de la superficie terrestre se considera como árida o semiárida y, del resto, una importante proporción está sujeta a periodos estacionales de sequía. La falta de agua es pues el principal limitante del crecimiento de las plantas en la tierra, siendo por tanto una fuerza selectiva de primer orden para la evolución y la distribución de las especies vegetales [Hanson y Hitz, 1982], así como un determinante esencial de la generación de alimentos para consumo humano. La irrigación es un recurso muy limitado, cada vez más caro y que está progresivamente contribuyendo a la salinización de los suelos. El estudio de los efectos del déficit hídrico en las plantas, la caracterización de los mecanismos de aclimatación a dicho estrés y el abordaje biotecnológico de dicho problema son, por lo tanto, de máximo interés para todos los países, cualquiera que sea su nivel de desarrollo.

La diversidad de los genes que van a ser descritos en los resultados de esta tesis cubren procesos celulares muy variados. Esto exige una exposición amplia de los efectos del déficit hídrico en las plantas y de las respuestas que éstas desarrollan para aclimatarse a las condiciones de estrés.

## I. EFECTO DEL DÉFICIT HÍDRICO EN LAS PLANTAS

Si tenemos en cuenta el aporte de agua requerido para el desarrollo normal de una planta, se consideran hidrófitas a aquellas plantas adaptadas a vivir total o parcialmente sumergidas en el agua (en general no toleran potenciales hídricos más negativos de -5 a -10 bares); mesófitas, aquellas adaptadas a un aporte moderado de agua (en general no toleran potenciales hídricos más negativos de -20 bares); y xerófitas, aquellas que están adaptadas a ambientes áridos (en general no toleran potenciales hídricos más negativos de -40 bares) [Levitt, Cap.4]. Las plantas de interés agrícola pertenecen al grupo de las mesófitas, por lo que requieren de un régimen constante de irrigación. Los valores de deshidratación que voy a definir están cuantificados en base a los efectos que producen en plantas mesófitas. Levitt define como deshidratación elástica o reversible a aquella que se verifica en un margen de deshidratación suave o moderado (entre 0 y -5 a -15 bares según la especie), y ocurre cotidianamente en las plantas por el efecto de la evapotranspiración diurna, incluso durante periodos de aporte regular de agua. Este grado de deshidratación no produce la desaparición del turgor en las células vegetales y, en términos generales, se considera que no afecta a la producción agrícola a pesar de disminuir el potencial hídrico de las hojas de las plantas a valores muy negativos (hasta -13 a -30 bares en diversas especies agrícolas) [Levitt, 1980, cap. 3]. Cuando la deshidratación es más severa y comienza a producir pérdida total del turgor (flacidez) en las células vegetales, se denomina deshidratación plástica. Produce muchas perturbaciones en el crecimiento y desarrollo de las plantas, afectando drásticamente la producción agrícola.

Sin embargo, investigaciones más recientes han demostrado que valores muy bajos de deshidratación (entre -1 y -10 bares) tienen efectos pronunciados en las plantas y promueven respuestas a diversos niveles. Los primeros efectos de la falta de agua en las plantas son la inhibición temporal del crecimiento y el cierre de los estomas. Si la deshidratación perdura, comienza a afectar a las estructuras y macromoléculas celulares, con los consecuentes efectos en el metabolismo celular. Sin embargo, aún antes de que ésto ocurra, los procesos de asimilación de carbono y producción de energía se han visto muy perturbados por el efecto del cierre de los estomas sobre el intercambio de gases, movilidad del agua en la planta y captación de nutrientes del suelo. Los daños causados por el déficit hídrico están muchas veces íntimamente asociados a los mecanismos de respuesta o de resistencia dirigidos a sobrellevar la condición de estrés, siendo en algunos casos muy difícil o imposible distinguir entre causa y consecuencia del estrés.

## Inhibición del crecimiento

El proceso más sensible al déficit hídrico en las plantas es la inhibición del crecimiento de sus órganos aéreos (hojas y tallo). El agua viaja desde las zonas donde su potencial hídrico es mayor (menos negativo) hacia las zonas donde éste es menor (más negativo). El potencial hídrico se define según la ecuación:

$$\Psi_w = P - \pi$$

donde " $\Psi_w$ " es el *potencial hídrico*; " $P$ " es la *presión de turgor* o la fuerza hidrostática ejercida en el interior de la célula vegetal contra la pared celular y es de signo (+); y  $\pi$  es la *presión osmótica*, que es una medida de la concentración de los solutos. La interacción del agua con los solutos disueltos en ésta tiene un efecto negativo sobre el  $\Psi_w$  ya que disminuye la cantidad de agua libre disponible en el sistema, por lo que se resta en la ecuación. La reducción en el valor del  $\Psi_w$  causado por la interacción del agua con los materiales insolubles y las paredes define al *potencial mátrico*, que no aparece en la ecuación por haberse comprobado empíricamente que su contribución al valor del  $\Psi_w$  es despreciable [Taiz, 1991, Cap. 3]. El turgor es, según la ecuación, directamente proporcional al potencial hídrico. Las hojas son los órganos de las plantas que verifican los potenciales hídricos más negativos porque en dicho órgano el agua se está perdiendo continuamente por evapotranspiración. Esto permite que el agua se movilice eficientemente desde la raíz hasta las hojas, pero también hace que valores ligeros de déficit hídrico comiencen a tener repercusiones en el turgor de las células foliares. La elongación celular consiste básicamente en un llenado de agua de la célula vegetal. En las hojas, la elevada tasa de pérdida de agua hace que el valor del turgor pueda estar frecuentemente en el límite del valor requerido para ejercer una fuerza que permita desarrollar la elongación celular. La expansión celular se describe a través de la ecuación:

$$TC = m (P - Y)$$

donde "TC" es la *tasa de crecimiento*; " $P$ " es la *presión de turgor*, " $Y$ " es el *umbral de rendimiento*, o la presión bajo la que la pared celular resiste una deformación plástica o irreversible; " $P-Y$ " define que la fuerza de turgor sea suficiente ( $P > Y$ ) o insuficiente ( $P < Y$ ) para desarrollar expansión celular; " $m$ " define la *extensibilidad de la pared celular*, o la respuesta de la pared a la presión [Taiz, 1991, Cap. 14]. Esta ecuación establece la relación lineal existente entre el turgor y el crecimiento. Como veremos más adelante, se ha comprobado

en numerosas ocasiones que valores de deshidratación que no producen pérdidas de turgor en las células de órganos aéreos, también producen inhibición del crecimiento (por ejemplo en los hipocotilos de plántulas que aún no han desarrollado hojas). Esto es parte de la respuesta de la plántula, que disminuye la extensibilidad de la pared (m) al inhibir la acidificación de la pared celular, y aumenta (Y) al modificar su composición [Taiz, 1991, Cap. 14]. La inhibición del crecimiento puede resultar de pérdidas desde -1 a -3 bares en el potencial hídrico, aunque las plantas pueden mantener o recuperar el crecimiento a potenciales hídricos mucho más negativos si ajustan adecuadamente el valor del potencial osmótico (fuerza ejercida por la acumulación de los solutos disueltos en el agua). La división celular supone la duplicación del volumen de la célula, mientras que la elongación celular requiere de un aumento de varias o muchas veces el volumen original. Esto supone que la elongación es un proceso mucho más sensible que la división a la falta de agua. Por lo tanto, la inhibición del crecimiento viene dada principalmente por la inhibición de la elongación celular.

### Cierre de los estomas

Otro proceso sensible al déficit hídrico, aunque no tanto como la inhibición del crecimiento, es el cierre de los estomas. Los estomas son grupos de células especializadas de la epidermis de las hojas que regulan el intercambio de gases de dichos órganos con la atmósfera, incluido el vapor de agua. Es la principal vía de pérdida de agua en la planta, misma que, como dijimos, promueve el movimiento del agua (savia) desde la raíz. Pero en condiciones de déficit hídrico el cierre de estomas se hace necesario para disminuir la pérdida de agua. Esto va a determinar una disminución inmediata en la captura de CO<sub>2</sub> atmosférico y, por lo tanto, de la fijación de carbono y energía a través de la fotosíntesis. Otro efecto de la disminución de la evapotranspiración es la reducción del enfriamiento evaporativo en las hojas. Esto hace que pueda aumentar la temperatura de la hoja varios grados centígrados respecto a una situación de transpiración normal, pudiendo generar daños asociados a estrés calórico [Taiz, 1991, Cap. 14]. El cierre de los estomas aumenta mucho la resistencia al flujo de agua (savia) en las plantas por las razones que ya hemos mencionado. Pero además existen otros factores adicionales que afectan a este proceso y a la captura de nutrientes del suelo: 1) la contracción de las raíces por colapsamiento de sus células supone la separación de dicho órgano de las partículas del suelo que retienen agua; 2) la suberización e impermeabilización del córtex externo de la raíz disminuye la captación de agua del suelo; y 3) la cavitación o rotura de la columna de agua ascendente [Taiz, 1991, Cap. 14].

## **Efectos a nivel metabólico**

A pesar de que los procesos fotosintéticos no son particularmente sensibles a valores moderados de deshidratación, se produce una caída drástica de la fotosíntesis como consecuencia del cierre de los estomas, al frenarse la captura de CO<sub>2</sub> atmosférico. Cuando la deshidratación comienza a ser severa se aumenta la sensibilidad del proceso de acople fosforilativo por Mg<sup>2+</sup> [Taiz, 1991, cap. 14], lo que disminuye la actividad de la enzima ribulosa difosfato carboxilasa/oxigenasa (rubisco) [Levitt, 1980, Cap. 3]. El cierre de los estomas también disminuye la difusión de O<sub>2</sub> y limita la respiración durante el déficit hídrico, aunque menos drásticamente de lo que se afecta la fotosíntesis. En algunas especies, sin embargo, se ha reportado un aumento de la tasa respiratoria cuando la deshidratación es moderada, aunque siempre se disminuye cuando la deshidratación es muy severa [Levitt, 1980, Cap. 3]. La desnaturalización de muchas proteínas y el cambio de actividades enzimáticas como consecuencia de una deshidratación severa (ver más adelante) van a perturbar en mayor o menor medida múltiples procesos metabólicos.

## **Efectos a nivel celular y subcelular**

Los daños en las estructuras celulares y en la integridad de sus macromoléculas comienzan a ocurrir con grados de deshidratación que producen pérdida en el turgor de las células vegetales. En el medio extracelular, las cámaras de aire existentes en los vértices de las células turgentes se colapsan y se expulsan los gases que contenían, empeorando aún más el intercambio de gases con las células. Intracelularmente se produce un colapsamiento del citoplasma y una separación de la membrana respecto de la pared celular [Levitt, 1980, Cap. 3]. Se han reportado diversos efectos de la deshidratación sobre la ultraestructura de diversos tipos de células vegetales en diferentes especies: condensación de la cromatina; fragmentación de la vacuola y ruptura del tonoplasto; desorganización del cloroplasto, desaparición de sus ribosomas e hinchamiento de los tilacoides; disminución del retículo endoplásmico rugoso y pérdida de sus ribosomas; dispersión de ribosomas citoplásmicos y despolimerización de microtúbulos [Levitt, 1980, Cap. 3].

## **Integridad de las biomoléculas**

La falta de disponibilidad de agua comienza a afectar también la estructura funcional de las membranas biológicas y de las proteínas. La interacción del agua con los fosfolípidos determina la organización y estabilidad de las bicapas lipídicas, que componen a las membranas biológicas. La

interacción de las moléculas de agua con los fosfolípidos determina que se dé una separación crítica entre sus cabezas polares, lo que confiere fluidez a las membranas. La deshidratación produce fenómenos como la fusión y la dispersión lateral de fosfolípidos, la formación de parches de gelificación y la pérdida de organización de la bicapa. Todo esto da lugar a una desorganización de la estructura de la membrana en puntos donde se produce la pérdida de fluido protoplásmico [Crowe, 1987]. Estos daños en la membrana plasmática también afecta a la organización de las proteínas presentes en ella, lo que perturba su permeabilidad selectiva. Todos estos daños producen la pérdida de iones y solutos intracelulares, afectándose la polaridad de la membrana y el mantenimiento de múltiples gradientes importantes para el funcionamiento celular. En el caso de las proteínas, su estructura primaria (secuencia de aminoácidos) determina su plegamiento adecuado, o funcional, cuando están siendo sintetizadas en un ambiente acuoso. La pérdida de agua severa en un sistema conduce a la desnaturalización o pérdida de la estructura funcional de muchas proteínas. Además, el aumento en la concentración de diversos solutos celulares (principalmente sales) y su eventual precipitación, genera gran toxicidad para muchas proteínas, principalmente enzimas. También se verifica una pérdida de ácidos nucleicos por varias razones: degradación, por un aumento en la actividad de las las enzimas hidrolíticas del ARN; disminución del contenido en polirribosomas, lo que incrementa la degradabilidad de los ARN-mensajeros; y disminución de su síntesis [Levitt, 1980, Cap. 3]. La Figura 1 muestra un resumen de las perturbaciones derivadas de la deshidratación en las plantas.

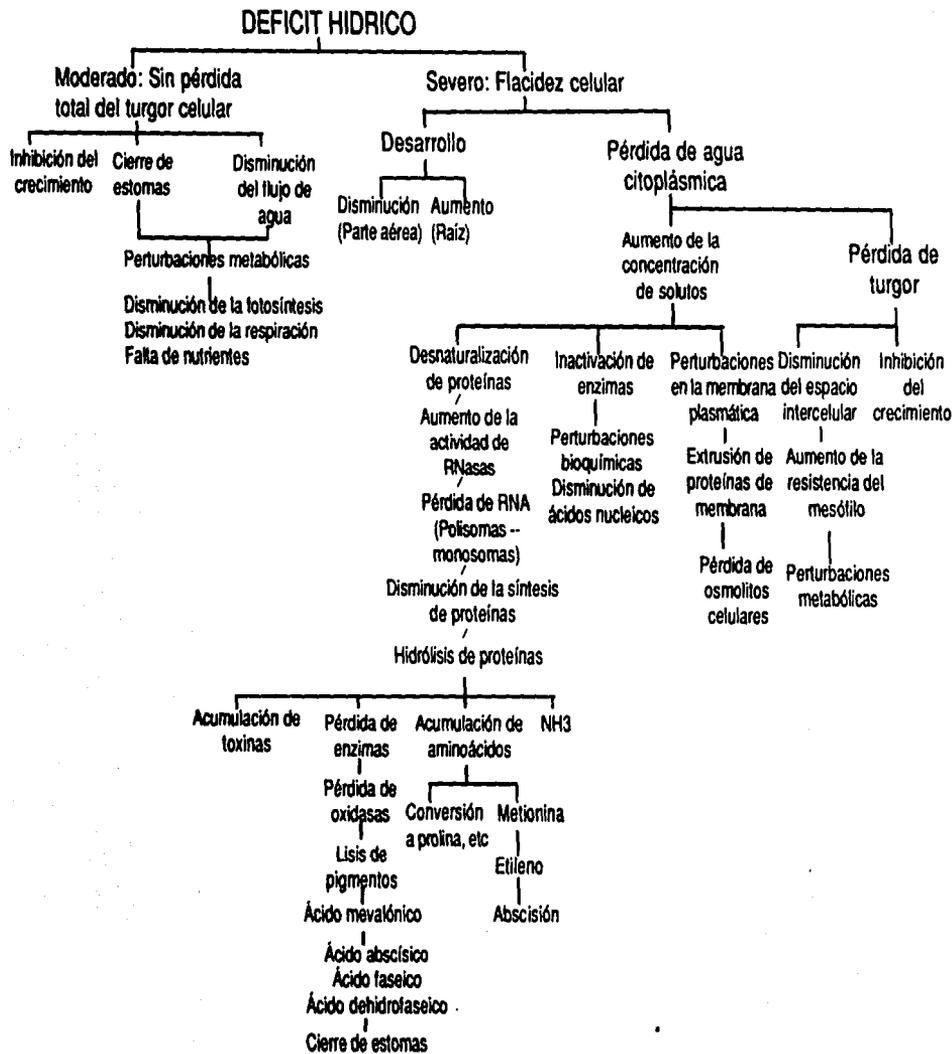


Fig. 1: Efecto del déficit hídrico en las plantas [Levitt, 1980]

## **Daños secundarios**

Los daños primarios generados por la deshidratación en una planta, descritos anteriormente, pueden dar lugar a la aparición de nuevos tipos de estrés que no la afectaban en condiciones de adecuada disponibilidad de agua. Por ejemplo, la pérdida de la evapotranspiración disminuye mucho la disipación de energía en las hojas y produce un aumento de su temperatura, lo que facilita la generación de un choque térmico en la planta, con los consecuentes daños propios de este tipo de estrés. Un fenómeno siempre asociado al déficit hídrico es el aumento de la fotorrespiración. Cuando disminuye la disponibilidad de CO<sub>2</sub> se reduce el O<sub>2</sub>, generándose especies reactivas de O<sub>2</sub> y daño oxidativo. Por otra parte, los organismos fitopatógenos pueden infectar con más facilidad a plantas estresadas por falta de agua, ya que la pérdida o disminución de muchas funciones celulares afecta a la capacidad de defensa de las plantas. La protección contra los estreses secundarios es tan importante para la planta como la protección contra la propia deshidratación. Prueba de ésto es que muchos de los genes directamente inducidos por déficit hídrico están relacionados con protección frente a otros estreses, como es el caso de genes que codifican para enzimas antioxidantes y proteínas antipatogénicas (ver sección IV de esta tesis).

## II. RESISTENCIA A LA SEQUÍA

Los mecanismos de resistencia a la sequía [Taiz, 19 Cap. 14] se pueden clasificar como:

- **Escape a la desecación** que consiste en completar el ciclo de vida en la estación húmeda. Esta estrategia se caracteriza por un rápido desarrollo fenológico de la planta tras la incidencia de lluvias y por la capacidad de alargar su estado de desarrollo reproductivo en tanto sean favorables las condiciones de humedad del suelo. Muchas plantas anuales que viven en regiones desérticas emplean este mecanismo [Turner, 1986].

- **Prevención de la desecación**, que consiste en mantener la hidratación de sus tejidos. Para ello se han descrito dos posibles estrategias [Levitt, 1980 Cap. 4]:

a) **Plantas ahorradoras de agua**, que conservan el agua en sus tejidos a base de limitar al máximo la evapotranspiración. Es el caso de las plantas suculentas, como el agave, que continuamente reutiliza la alta cantidad de agua almacenada en sus tejidos. Algunos de los mecanismos que usan estas plantas para ahorrar agua son:

- el cerrado de los estomas en condiciones de baja humedad
- el establecimiento de barreras contra la transpiración cuticular
- la disminución de la superficie de transpiración
- las adaptaciones de impermeabilización en las raíces
- la presencia de tejidos almacenadores de agua
- la generación de agua metabólica
- el uso del metabolismo CAM.

b) **Plantas derrochadoras de agua**, que compensan la alta cantidad de agua que pierden mediante una rápida y eficiente absorción de agua en las raíces, como el árbol del mesquite, que desarrolla raíces extremadamente largas que profundizan hasta encontrar mantos acuíferos.

- **Tolerancia a la desecación** que consiste en la capacidad de reestablecer total o parcialmente el desarrollo en condiciones de déficit hídrico. Estas plantas desarrollan mecanismos que contrarrestan los efectos de la deshidratación:

- ajuste osmótico
  - \* mantenimiento del turgor y del crecimiento celular
  - \* estabilización de macromoléculas
- compartimentalización de iones
- cambios de las propiedades físicas de la pared celular
- síntesis de proteínas protectoras de la maquinaria celular
- síntesis de enzimas y metabolitos antioxidantes
- ajustes fisiológicos
  - \* apertura de estomas a bajos potenciales hídricos

\* desacople de la fotosíntesis frente a la transpiración.

Los diversos mecanismos de resistencia a la desecación no son excluyentes entre sí. Por el contrario, en una especie vegetal se emplean generalmente una diversidad de estos mecanismos. Todas las plantas cuentan con mecanismos de tolerancia a la desecación, aunque lo desarrollen a diferentes grados. Es importante destacar que casi todas las plantas desarrollan una enorme capacidad de tolerancia a la desecación durante parte de su ciclo de vida, que corresponde al estado de semilla seca, donde el grado de deshidratación de los tejidos ronda el 95%. Las respuestas de los tejidos vegetales al estrés es compleja, dependiendo dentro de un mismo organismo de las propiedades fisiológicas de las células que los componen y de las características anatómicas que regulan la transmisión del efecto del déficit hídrico hacia las células (Katterman, 1990, Cap. 4). Como se mostrará más adelante en esta tesis, el propio estado de desarrollo del tejido es también un factor esencial en la determinación de la respuesta al déficit hídrico (ver Cap. 2 de esta tesis).

## 1. Mecanismos que previenen la desecación

### 1.1. Inhibición del crecimiento de la parte aérea y potenciamiento del crecimiento de la raíz

Es una respuesta muy sensible al estrés. La relación de crecimiento entre la parte aérea y la raíz se ve profundamente afectada por la disponibilidad de agua: la raíz continúa su desarrollo mientras que la parte aérea deja de crecer por causa del estrés. El crecimiento de la parte aérea está principalmente limitado por la cantidad de agua capaz de ser absorbida por la raíz, mientras que el crecimiento de la raíz depende de los fotosintatos aportados por la parte aérea. Como ya se ha descrito, cuando empieza a faltar agua se detiene la expansión de las células de la parte aérea, mientras que la fotosíntesis se ve mucho menos perturbada y permite mantener el crecimiento de la raíz [Taiz, 1991, Cap. 14]. Pero esta regulación diferencial del crecimiento no sólo es consecuencia de los efectos fisiológicos del estrés, sino que también está controlada por la planta a través de la disminución de los compuestos que promueven el crecimiento y el aumento de los compuestos que lo retardan. El compuesto mejor caracterizado es la fitohormona ácido abscísico (ABA) [Levitt, 1980, Cap. 3]. El ABA está implicado en el proceso de la dormancia de yemas en especies leñosas durante la estación fría, participa en la inducción de la dormancia de las semillas maduras e inhibe el crecimiento inducible por auxinas mediante el bloqueo de la secreción de  $H^+$  hacia la pared celular [Taiz, 1991, Cap.19]. Además, la fitohormona ABA media respuestas relacionadas con

protección frente al estrés osmótico provocado por diversas perturbaciones medioambientales (deseccación, salinidad y frío), como el cierre de estomas, la reducción del número de estomas por hoja, la disminución del tamaño celular, el aumento de la producción de tricomas, la acumulación de prolina libre (Levitt, 1980, Cap. 3) y la inducción de un grupo particular de genes. Además, la aplicación exógena de ABA inhibe en muchas plantas el crecimiento de su región aérea sin afectar al desarrollo de la raíz. Respecto al efecto del déficit hídrico sobre las hormonas promotoras del crecimiento, se ha reportado disminución del contenido de citoquininas (CK) y de ácido giberélico (GA) y una disminución del transporte basipétalo de auxinas (IAA) (Levitt, 1980, Cap. 3). La disminución en el crecimiento de áreas de transpiración y el aumento en el desarrollo de raíces capaces de buscar agua en zonas más profundas del suelo tienen una ventaja evidente en la adaptación de las plantas al déficit hídrico.

### 1.2. Cierre de estomas

Los estomas son los responsables de la mayor proporción de pérdida de agua en las plantas. Es, por lo tanto, muy importante detener dicha pérdida en condiciones de estrés hídrico. El proceso de cerrado de los estomas cuando el mesófilo comienza a sufrir deshidratación está regulado por la hormona ABA, cuya síntesis aumenta bajo diversas situaciones de estrés. Además, el ABA, que está compartimentalizado en los cloroplastos de las células del mesófilo, es liberado al apoplasto, llegando a las células guarda a través de la corriente de transpiración. Esta fitohormona produce en las células guarda una pérdida de iones  $K^+$  (calculada en 4-8 veces de disminución, desde 400-800 mM hasta 100 mM), y de aniones  $Cl^-$  y/o malato<sup>2-</sup>, lo que provoca una salida de agua del citoplasma de dichas células, dando lugar al cerrado del estoma [Taiz, 1991, Cap. 6].

### 1.3. Disminución del área foliar

Es una respuesta rápida adoptada por muchas plantas cuando se enfrentan al déficit hídrico. Se verifica de diversas formas: 1) la rápida inhibición del crecimiento foliar que ya hemos descrito; 2) el enrollamiento o plegamiento de las estructuras foliares para disminuir así el área de exposición al ambiente; y 3) la disminución del área de transpiración mediante la estimulación de la abscisión foliar o caída de la hoja. La abscisión foliar se verifica típicamente en muchas plantas desérticas de hoja caduca y es un proceso controlado por la síntesis de etileno [Taiz, 1991, Cap. 14].

### 1.4. Eficientización del uso del agua

Consiste en un máximo aprovechamiento del agua a través de limitar al máximo su pérdida sin afectar drásticamente al metabolismo. Como hemos

visto, la forma más eficiente de ahorrar agua es la de mantener los estomas cerrados [Levitt, 1980, Cap. 3]. Las plantas suculentas, adaptadas a vivir en climas áridos, han desarrollado una estrategia para mantener cerrados los estomas durante el día y abiertos durante la noche sin afectar a su capacidad fotosintética. Se trata del metabolismo del ácido crasuláceo (metabolismo CAM), que consiste en una separación temporal de la fijación del CO<sub>2</sub> respecto a las reacciones luminosas de la fotosíntesis. El CO<sub>2</sub> atmosférico se acumula durante la noche, cuando la mayor humedad del ambiente permite tener los estomas abiertos [Taiz, 1991, Cap. 9]. El CO<sub>2</sub> se asimila como ácido málico y se almacena en la vacuola durante la noche (Fig. 2).

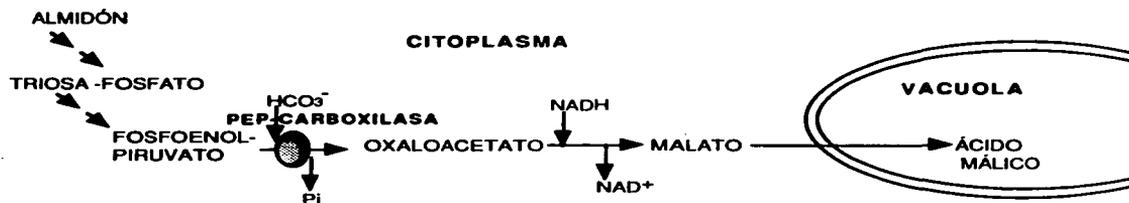
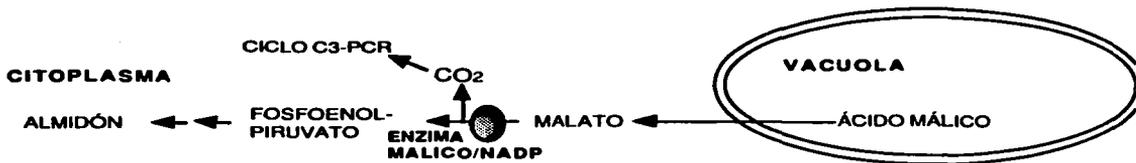


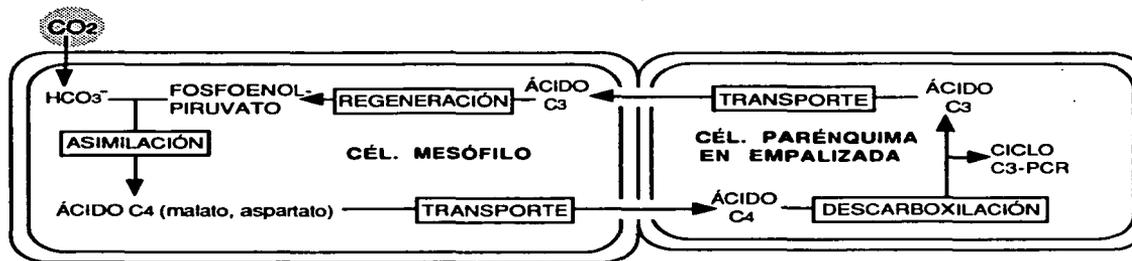
Fig. 2: Fotosíntesis CAM, reacciones nocturnas

Con la llegada del día se cierran los estomas, lo que detiene la asimilación de CO<sub>2</sub> y previene la pérdida de agua. Se metaboliza el ácido málico, produciéndose CO<sub>2</sub> que, con el ATP y el poder reductor generados en las reacciones luminosas de la fotosíntesis, va a ser reducido a carbohidratos en el ciclo de Calvin o ciclo C<sub>3</sub>-PCR (Fig. 3). Además, la alta concentración de CO<sub>2</sub> generada en el citoplasma celular reduce la fotorrespiración drásticamente y, como consecuencia, el daño oxidativo.



**Fig. 3:** Fotosíntesis CAM, reacciones diurnas

Algunas especies suculentas desarrollan el metabolismo CAM sólo en condiciones de estrés hídrico o salino, como es el caso de *Mesembryanthemum crystallinum* o planta del hielo. Las hierbas tropicales y algunas dicotiledóneas también desarrollan un metabolismo que eficientiza el uso del agua comparado con las plantas  $C_3$ . Se trata del metabolismo  $C_4$ , y su estrategia consiste en una separación física entre el proceso de asimilación de  $CO_2$ , que se produce en células del mesófilo, y la reducción de éste a carbohidratos en otro tipo celular especializado (parénquima en empalizada) donde se acumula el  $CO_2$ . En este metabolismo también se reduce drásticamente la fotorrespiración comparado con el metabolismo  $C_3$ .



**Fig. 4:** Fotosíntesis  $C_4$

Para fijar 1g de  $CO_2$ , las plantas  $C_3$  requieren de 400-500 g de agua, las plantas  $C_4$  requieren de 250-300 g de agua y las CAM sólo 50-100 g de agua.

### 1.5. Estimulación del desarrollo cuticular

La cutícula es una capa de compuestos hidrofóbicos (principalmente ceras) que sirve de aislante frente a la pérdida de humedad. Durante el déficit hídrico se desarrolla una cutícula más gruesa que reduce la pérdida de agua por transpiración a través de la epidermis. La transpiración cuticular supone el 5-10% de la pérdida total de agua, por lo que adquiere significancia sólo cuando el estrés es muy severo o la cutícula está dañada [Taiz, 1991, Cap. 14].

## **2. Mecanismos de tolerancia a la deshidratación**

### 2.1. Ajuste osmótico

Es uno de los mecanismos de aclimatación que de forma más importante contribuye a la adquisición de tolerancia a la deshidratación. Consiste en una disminución del potencial hídrico de los tejidos vegetales no acompañada de una disminución en el turgor. Se consigue aumentando la concentración intracelular de solutos intracelulares. Si recordamos la ecuación,

$$\Psi_w = P - \pi$$

aumentando el valor del potencial osmótico ( $\pi$ ), disminuimos el valor del potencial hídrico ( $\Psi_w$ ). Un suelo deficiente en agua posee un potencial mátrico muy negativo, lo que significa que el agua que aún le queda está muy establemente asociada a las partículas que lo componen, haciendo que sea muy difícil extraerle el agua. Las plantas que se ajustan osmóticamente disminuyen su potencial hídrico, aumentando la fuerza de captación de agua. Los valores típicos de aumento de  $\pi$  oscilan entre 2 y 8 bares, pudiendo ser mucho mayores en plantas adaptadas a ambientes áridos. Dado que la acumulación de solutos se produce intracelularmente, las células obtienen agua del medio extracelular sin llegar a experimentar una pérdida de turgor (P). El ajuste osmótico permite incluso una recuperación del crecimiento de los órganos aéreos cuando el déficit hídrico aún persiste [Meyer and Boyer, 1981; Creelman, 1990]. La raíz también se ajusta osmóticamente, aunque menos que las hojas. Sin embargo, la punta de la raíz sufre un ajuste osmótico más severo, probablemente para garantizar la promoción del desarrollo radicular durante el estrés hídrico [Creelman et al., 1990]. El ajuste osmótico se ejerce en las plantas a través de la biosíntesis de osmolitos orgánicos de bajo peso molecular y por la acumulación de iones, fundamentalmente  $K^+$ . Por lo general las enzimas son sensibles a las altas concentraciones de iones, como el  $Na^+$ , por lo que la acumulación de iones durante el ajuste osmótico ocurre principalmente en la vacuola (por ejemplo, 1M de  $Na^+$  en la halofita *M. crystallinum*), mientras que en el citoplasma se acumulan solutos que no afectan negativamente la funcionalidad de

macromoléculas celulares. Estos solutos son moléculas orgánicas de bajo peso molecular (osmolitos) como polioles (azúcares), metilaminas, aminoácidos libres y derivados de aminoácidos, como describimos en la Tabla 1.

**Tabla 1: osmolitos compatibles que acumulan las plantas**

<u>AZÚCARES</u>	<u>AMINOÁCIDOS</u>	<u>DERIVADOS DE AMINOÁCIDOS</u>	<u>METILAMINAS</u>
Glucoosa Fructosa Sacarosa Trehalosa Pinitol Manitol Fructanos	Prolina	<u>Compuestos de aminos cuaternarios</u> Colina-O-sulfato $\beta$ -alanina-betaína Glicín-betaína Prolín-betaína Hidroxi-prolín-betaína <u>Compuestos de sulfonio terciario</u> Dimetilsulfonio-propionato (DMSP)	Betaína

No sólo las plantas, sino también las bacterias, los hongos y los animales han convergido en la selección de ciertos osmolitos que poseen la propiedad de no alterar la estructura y función de las macromoléculas cuando se acumulan a altas concentraciones. Por esta razón se llaman osmolitos compatibles. Se propone que los osmolitos compatibles no interaccionan con substratos ni cofactores enzimáticos, ni afectan negativamente a las interacciones entre las macromoléculas y el solvente [Yancey et al., 1982]. La acumulación de osmolitos compatibles tiene otra consecuencia de primera importancia para la adquisición de tolerancia a la desecación: la osmoprotección. Se trata de la capacidad estabilizadora de estos solutos sobre macromoléculas como las proteínas y los sistemas de membrana celulares. Por ejemplo, los disacáridos sacarosa, maltosa y trehalosa estabilizan *in-vitro* la actividad de la enzima fosfofructoquinasa [Carpenter et al., 1987] y la organización funcional de los sistemas de membrana [Crowe, 1987]. La naturaleza físico-química de estos fenómenos no es bien conocida, y será un tema de análisis en el capítulo 4 de esta tesis. También se ha demostrado *in-vitro* que algunos azúcares solubles, como los que algunas plantas usan para ajustarse osmóticamente, son capaces de amortiguar radicales libres, protegiendo la estabilidad de enzimas [Smirnoff, 1989]. Se ha demostrado *in-vivo* que la acumulación de manitol en cloroplastos de tabaco transgénico disminuye la concentración de radicales OH-en dicho organelo. La planta transgénica mejora su capacidad fotosintética y aumenta su resistencia a estrés oxidativo [Richard et al., 1997]. Por último, los osmolitos podrían eliminar iones tóxicos. Por ejemplo, el osmolito colina-O-sulfato, que contiene un grupo sulfato, podría detoxificar dicho ión al incorporarlo a la molécula orgánica, que se acumula a altas concentraciones durante el estrés

(Hanson et al., 1994).

Se propone que ciertos osmolitos protegen mejor que otros frente a un determinado tipo de estrés. Esto puede ser una de las razones de la diversidad de osmolitos que hay en la naturaleza: la  $\beta$ -alanina-betaína se acumula preferentemente en especies que crecen en suelos salinos y las prolina-betaínas en plantas que viven en ambientes áridos (Hanson et al., 1994). Un ejemplo claro sería el ya citado de la colina-O-sulfato, cuya acumulación favorece a plantas que viven en suelos ricos en sales de sulfato. Este postulado se refuerza por el hecho de que existe especificidad entre la naturaleza de los osmolitos y la protección frente a ciertos agentes estresantes. Por ejemplo, el sorbitol, el manitol, el mio-inositol y la prolina son efectivos amortiguadores de radicales libres, pero la glicín-betaína es completamente inefectiva [Smirnoff y Cumbes, 1989]. Sin embargo, el fenotipo de hipersensibilidad a NaCl en un mutante de *S. aureus* es únicamente rescatado con glicín-betaína y no con otros osmoprotectores como la prolina [Vijaranakul et al., 1997]. Es probable además que el tipo de osmolito acumulado dependa del tipo de metabolismo de la especie vegetal en cuestión.

## 2.2 Homeostasis y compartimentalización de iones

El estrés hídrico perturba la homeostasis iónica. En condiciones normales las células vegetales contienen 100-200 mM de  $K^+$  y 1mM de  $Na^+$  [Taiz, 1991, Cap. 14]. El balance iónico en las células es crucial para su correcto funcionamiento ya que afecta procesos como el mantenimiento del potencial de la membrana plasmática, la generación de energía metabólica, el transporte de compuestos a través de las membranas y el funcionamiento de enzimas y proteínas sensibles a ciertos iones. La pérdida de los balances iónicos en células estresadas da lugar a un aumento en la concentración intracelular de  $Na^+$ , catión altamente tóxico para muchas enzimas. Diversos estudios fisiológicos han establecido que las plantas que se están aclimatando a condiciones de deshidratación y salinidad promueven la excreción de  $Na^+$  de la raíz y la compartimentalización del mismo catión en las vacuolas de las células de la hoja. En la planta del hielo, adaptada a vivir en ambientes muy salinos, el  $Na^+$  se acumula a una concentración de 1M en las vacuolas de las células de las glándulas salinas, mientras que el D-pinitol, osmolito compatible compensador, se acumula en el citoplasma [Bohnert et al., 1995].

### III. GENES INDUCIDOS POR DÉFICIT HÍDRICO: CARACTERIZACIÓN DE SUS PRODUCTOS Y DE LOS PROCESOS IMPLICADOS

La biología molecular ha resultado en un vigoroso empuje al conocimiento de los procesos celulares implicados en la adquisición de tolerancia al déficit hídrico en las plantas. La caracterización de las proteínas codificadas por genes que responden a déficit hídrico ha servido para mejorar los conocimientos de algunos de los mecanismos de resistencia descritos en la sección anterior y para descubrir nuevos procesos desarrollados por las células vegetales durante la adquisición de tolerancia a la deshidratación. Los modelos de estudio que han servido para la caracterización de genes son muy variados. Una estrategia usada en diversos laboratorios es el uso de sistemas tolerantes a la desecación, como las semillas de plantas superiores o las especies vegetales de resurrección. Las semillas son un buen modelo porque toleran el 90% de deshidratación o aún más sin que se afecte la viabilidad del embrión. Las plantas de resurrección pueden perder el 98% del agua de sus tejidos y recuperar sus funciones normales a las pocas horas de ser rehidratadas. Sin embargo, muchos laboratorios optan por usar plantas mesófitas (sensibles al déficit hídrico) porque es el grupo al que pertenecen las plantas de interés agrícola y porque poseen el potencial genético para tolerar la deshidratación (cuando son semillas). De hecho, los mismos tipos de mecanismos de tolerancia a sequía operan en las plantas de resurrección y en las plantas mesófitas, aunque éstas los desarrollan a un grado mucho menor. A continuación se van a explicar estos mecanismos a través de la descripción de los genes involucrados en su desarrollo. En la Fig. 5 se muestra un esquema donde se resume el grupo de mecanismos celulares de adquisición de tolerancia a la deshidratación.

#### 1. Compartimentalización de iones

En la sección anterior destacamos cómo la extrusión de  $\text{Na}^+$  o su compartimentalización en la vacuola es una respuesta importante en las plantas estresadas. Hasta la fecha no se ha purificado en plantas superiores ningún antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . En levadura se ha aislado un gen que codifica para un putativo antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  mediante el rescate de transformantes resistentes a  $\text{Li}^+$ . La sobreexpresión de dicho gen, *sod2*, aumenta la tolerancia del organismo a  $\text{Na}^+$  (Jia et al., 1992). En plantas halófitas (*A. nummularia*) y glicófitas (tabaco) se ha caracterizado un incremento en la traslocación de  $\text{H}^+$  en

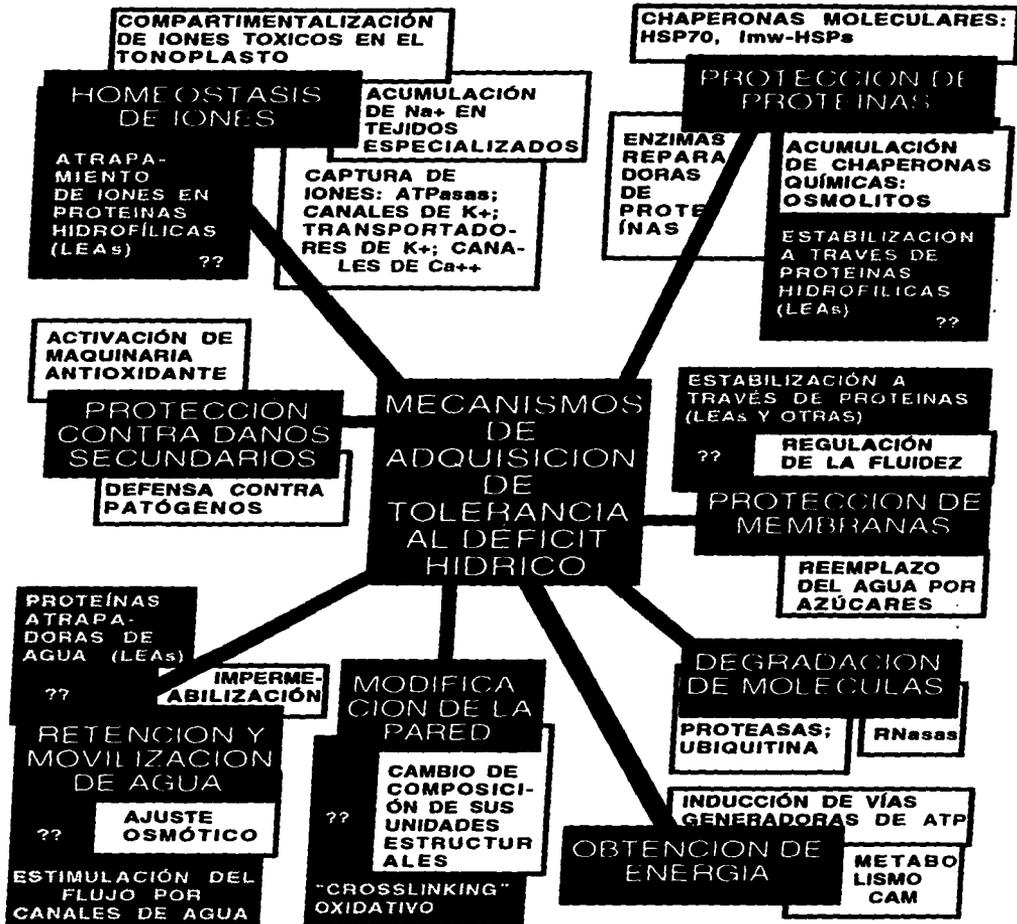


Fig. 5: Estrategias de tolerancia al déficit hídrico. Los cuadros blancos representan funciones comprobadas, y los grises representan funciones hipotéticas.

respuesta a tratamiento con NaCl, así como la inducción transcripcional del gen que codifica para la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática en la planta halófila (Niu et al., 1995). En otra halófila, *M. crystallinum*, la subunidad c de una ATPasa de H<sup>+</sup> se induce transcripcionalmente por NaCl [Tsiantis et al., 1996]. La generación del gradiente de H<sup>+</sup> en estas halófitas está probablemente dirigida a energizar el transporte de Na<sup>+</sup> mediante el putativo antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, ya sea para la extrusión de este ión en el caso de *A. nummularia*, o su compartimentalización en la vacuola en el caso de *M. crystallinum*.

## 2. Degradación y reparación de proteínas

Se han clonado genes, cuya expresión se induce por deshidratación que codifican para proteínas similares a proteasas. También se ha reportado la inducción de un gen que codifica para una proteína de extensión de ubiquitina, que por procesamiento proteolítico da lugar a ubiquitina activa, una molécula que marca proteínas para su posterior proteólisis [Ingram y Bartels, 1996]. Este tipo de proteínas podrían estar implicadas en la degradación de las proteínas desnaturalizadas por efecto de la deshidratación. Las proteasas pudieran ser importantes en el metabolismo celular durante el estrés, previniendo la redundancia de proteínas y despolimerizando los complejos vacuolares de proteínas de almacenamiento, lo que generaría los aminoácidos libres necesarios para la síntesis masiva de nuevas proteínas [Ingram y Bartels, 1996]. Un efecto deletéreo del estrés pudiera ser la modificación química de los residuos de las proteínas, como la desaminación, isomerización y oxidación. De hecho se ha reportado que un factor importante para la resistencia de los musgos a la deshidratación se basa en su capacidad para reparar la maquinaria celular durante la rehidratación. La inducción por ABA de una L-isoaspartil-metil transferasa en trigo podría estar implicada en la conversión de residuos dañados L-isoaspartilo a residuos L-aspartilo funcionales [Mudgett y Clarke, 1994].

## 3. Metabolismo

Las modificaciones en el metabolismo primario son una consecuencia general del estrés en las plantas, y no sólo por déficit hídrico. Se cree que una mayor demanda de energía es una respuesta común de las plantas frente a condiciones medioambientales adversas. En muchas plantas se ha comprobado un incremento en el metabolismo respiratorio como respuesta al déficit hídrico. *Craterostigma plantagineum* induce un gen que codifica para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GPD) en respuesta a déficit hídrico, aplicación de ABA y otros estreses. Umeda et al., (1994) desarrollaron un análisis extensivo

de los niveles de ARNms de genes implicados en las vías generadoras de ATP en cultivos celulares de arroz sometidos a estrés osmótico, salino, por frío y por carencia de nitrógeno. Encontraron una respuesta común de inducción en muchos de esos genes por los diversos estreses, atribuyéndosela a un mecanismo que emplean las células estresadas para facilitar la recuperación de la homeostasis celular a través de la producción de energía. Espartero et al., (1995) sugieren que la inducción por estrés osmótico y ABA del gen GLX1, que codifica para una glicoxalasa-I, potenciaría la glicolisis en plantas estresadas, lo que permitiría una mayor generación de ATP.

Otra respuesta de la planta frente al estrés parece ser la redistribución del carbono. El déficit hídrico estimula la acumulación de fructosa-2, 6-bisfosfato en hojas de sorgo, lo que modula la síntesis de sacarosa y la partición del carbono [Ramachandra-Reddy, 1996]. El metabolismo del fructano (moléculas de polifruktosa que funciona como reserva de carbono en el 15% de las especies florales), también se ha implicado en la respuesta a estrés [Spollen, 1994]. Cuando el tabaco (no acumulador de fructano) es transformado con un gen bacteriano que permite que acumule fructanos, aumenta la tolerancia de dicha planta al déficit hídrico [Pilon-Smits et al., 1995]. Los mecanismos de distribución de carbono están muy probablemente relacionados con la necesidad de las plantas estresadas de acumular rápida y eficientemente carbohidratos solubles u otros osmolitos compatibles dirigidos al ajuste osmótico (ver el siguiente apartado).

La inducción de la enzima PEP-carboxilasa (PPC) en *M. crystallinum* (planta del hielo) sometidas a estrés es uno de los factores implicados en la adquisición del metabolismo CAM, que permite un gran ahorro de agua para la planta (ver pg. 12). Una enzima PPC constitutiva, codificada por el gen *ppc2*, se expresa a bajo nivel y proporciona intermediarios C<sub>4</sub> al ciclo de Krebs. El estrés osmótico induce la acumulación del transcrito correspondiente al gen *ppc1*, que codifica para otra enzima PPC, específica de metabolismo CAM [Vernom et al., 1993].

#### 4. Ajuste osmótico y osmoprotección

Se han caracterizado diversos genes que responden a déficit hídrico y que participan en la biosíntesis de osmolitos compatibles que, como ya mencionamos, cumplen dos funciones difíciles de separar mecánicamente: el ajuste osmótico y la osmoprotección. En la Tabla 2 enumeramos dichos genes y la información referente a su caracterización.

**Tabla 2: genes implicados en la síntesis de osmolitos compatibles**

GEN (ENZIMA)	ESPECIE	INDUCIBILIDAD	OSMOLITO	REF.
Betaín aldehído deshidrogenasa	Cebada	Sequía, ABA	Glicín-betaína	Ishitani, 1995
$\delta$ -pirrolín-carboxilato sintetasa	<i>A. thaliana</i>	Sequía	Prolina	Yoshiba, 1995
Sacarosa-fosfato sintasa	<i>C. plantagineum</i>	Sequía	Sacarosa	Ingram, 1996
Inositol-O-metil transferasa	<i>M. crystallinum</i>	Salinidad, frío	D-pinitol	Vernom, 1992
Colina sulfotransferasa	Plumbagináceas	Salinidad	Colina-O-sulfato	Rivoal, 1994
Betaín aldehído deshidrogenasa	Amararanto	Osmótico	DMSF	Vojtechová, 1997
Colina monooxigenasa	Caña de azúcar	Sequía, NaCl	Glicín-betaína	Russell, 1997

No sólo la síntesis, sino también el transporte y la degradación de osmolitos compatibles, pueden ser regulables por el estatus hídrico. Esto ocurre con el gen que codifica para el transportador de prolina en *A. thaliana*, *ProT2*, que se induce por estrés osmótico [Rentsch et al., 1996]; el gen de la enzima que degrada la prolina, prolina deshidrogenasa, que está regulado positivamente por prolina y negativamente por deshidratación [Kiyosue et al., 1996]; y el gen de la enzima que degrada manitol, manitol deshidrogenasa, que está regulado negativamente por NaCl en *A. graveolens*. [Williamson et al., 1995].

### 5. Facilitamiento del flujo de agua (acuaporinas)

Recientemente se han caracterizado translocadores específicos de agua, conocidos como canales de agua o acuaporinas, que facilitan el flujo de agua a favor del gradiente de osmolaridad existente [Chrispeels and Maurel, 1994]. La inducción de estos genes se ha relacionado con procesos de expansión celular y se han descrito algunos casos donde responden a déficit hídrico. El gen de una acuaporina de tonoplasto,  $\gamma$ -TIP, se induce en células que están en activa elongación [Ludevid et al., 1992]. En *Arabidopsis*, una acuaporina de membrana plasmática se induce por luz azul y se expresa principalmente en células en expansión [Kaldenhoff et al., 1995]. La acuaporina RD28, que parece ser de membrana plasmática [Chrispeels y Maurel, 1994], se induce por desecación [Yamagushi-Shinozaki et al., 1992]. Otros genes homólogos al de RD28 se han descrito como inducibles por desecación en especies como *P. sativum*, *A. thaliana* y *C. plantagineum* [Ingram y Bartels, 1996].

### 6. Integridad de los sistemas de membrana

Existen datos que indican que diversos organismos se aclimatan a cambios de temperatura a través de modificar la composición de fosfolípidos, lo que da lugar a cambios en la fluidez de las membranas. Esta estrategia está poco explorada durante el estrés osmótico en plantas, aunque hay algunos datos

descritos. En células de tabaco aclimatadas a estrés osmótico aumenta la saturación en los ácidos grasos de los fosfolípidos, lo que a su vez correlaciona con un aumento en la acumulación de los transcritos de los genes de una desaturasa acarreadora de  $\delta$ -9-estearoil-acil y de una 12-oleoil desaturasa [Leone et al., 1996]. Además, se ha comprobado que plantas transformadas con una desaturasa de ácidos grasos obtenida de una bacteria permiten aumentar los niveles de lípidos desaturados y disminuir la sensibilidad de la planta a estrés por frío [Murata et al., 1992]. Ya mencionamos que ciertos azúcares solubles son capaces de estabilizar *in-vitro* bicapas de fosfolípidos deshidratadas [Crowe et al., 1983 y 1987], proceso que *in vivo* pudiera verificarse a través de la acumulación de osmolitos compatibles. Las poliaminas (putrescina, espermidina y espermina) son moléculas implicadas en procesos de desarrollo (división celular y desarrollo embrionario) y aclimatación a diversos estreses en las plantas y otros organismos. *A. thaliana* acumula putrescina durante su aclimatación al estrés osmótico debido a un aumento en la actividad de las enzimas arginina decarboxilasa (ADC) y ornitina decarboxilasa (ODC) [Feirer et al., 1997]. Tratamientos con espermidina y espermina previenen el daño de las membranas tilacoidales de protoplastos de células vegetales sometidos a estrés osmótico [Besford et al., 1993]. En *Avena sativa* también se ha observado protección de membranas tilacoidales por poliaminas, comprobándose que al menos uno de los mecanismos implicados en dicha protección es la inhibición de la peroxidación de lípidos [Tiburcio et al., 1994]. Células transgénicas de zanahoria que sobreexpresan ODC acumulan más putrescina y no sufren inhibición de la síntesis de proteínas tras un choque salino comparadas con las control [Minocha y Sun, 1997]. Se están investigando proteínas que pudieran ser estabilizadoras de membrana. El producto del gen *dsp-22* de *C. plantagineum* se acumula en el cloroplasto en respuesta a sequía. Este gen es homólogo a genes de proteínas inducibles tempranamente por luz (ELIP), inducidos en respuesta a varios estreses y que podrían participar en el ensamblaje del fotosistema en las membranas tilacoidales (Ingram y Bartels, 1996).

## 7. Genes de choque térmico (lmw-hsps)

Se trata de varias familias de genes conservados desde las bacterias hasta los mamíferos y que se inducen fuerte y rápidamente cuando el organismo sufre estrés por calor. Diversas proteínas de choque térmico (HSPs) se han caracterizado funcionalmente como chaperonas moleculares, que se distinguen por cumplir algunas de las siguientes funciones:

- prevenir el plegamiento incorrecto de proteínas inmaduras
- prevenir el plegamiento incorrecto de proteínas que están siendo translocadas a través de una membrana

- aumentar la estabilidad de las proteínas en su conformación nativa
- facilitar el plegamiento u oligomerización correcto de proteínas desnaturalizadas
- prevenir la agregación de proteínas desnaturalizadas
- deshacer agregados de proteínas desnaturalizadas.

La inducción de los genes de las HSPs se produce también por otros estímulos diferentes al calor, como análogos de aminoácidos, puromicina, etanol, metales pesados, arsénicos, etc., procesos que tienen en común producir la desnaturalización generalizada de proteínas. En general, el déficit hídrico no se considera un estímulo para los genes *hsp*s, habiéndose comprobado que la mayor parte de las HSPs no se sintetizan en respuesta a estrés hídrico [Bonham-Smith et al., 1988; Chen y Tabaeizadeh, 1992; Oliver, 1991; Burke et al., 1985]. Sin embargo, se han reportado algunos genes de choque térmico inducidos por deshidratación, como una HSP de 26 KDa homóloga a genes *hsp*s de bajo peso molecular (*lmw-hsp*s) [Czarnecka, 1988], tres *hsp*s diferentes de *Arabidopsis*, *Athsp70-1*, *Athsp81-2* y *UBQ1*, [Kiyosue et al., 1994] y dos genes *lmw-hsp*s de girasol [Almoguera et al., 1992 y 1993]. De hecho, se ha comprobado que existe protección cruzada entre el estrés hídrico y el calórico [Anandarajah, 1991; Harrington, 1988]. En particular, las *lmw-hsp*s que reportan Almoguera et al. (1992) no sólo responden a sequía, sino que sus transcritos están altamente acumulados en la semilla seca. Ellos sugieren que, al menos en las plantas, las LMW-HSPs juegan un importante papel en la adquisición de tolerancia a la desecación. A diferencia del resto de los organismos estudiados, las plantas contienen múltiples genes de LMW-HSPs. Son proteínas de tamaño comprendido entre 15 y 28 KDa que pertenecen a, por lo menos, 5 familias génicas que se agrupan en base a la homología en sus secuencias de aminoácidos, su distribución intracelular y sus propiedades de agregación [revisado en Vierling, 1991; Waters, 1995]. Se clasifican en:

- Clase I y Clase II (Citoplásmicas).
- Clase III (cloroplásticas).
- Clase IV (de la membrana del retículo endoplásmico).
- Clase V (mitocondriales)

La función *in vivo* de las LMW-HSPs se desconoce, aunque se ha comprobado que *in-vitro* poseen función de chaperonas independientes de ATP [Jakob et al., 1993; Lee et al., 1995]. En plantas se ha demostrado que durante el estrés por calor, las LMW-HSPs forman agregados que retienen grupos específicos de ARNs [Nover et al., 1989].

## 8. Modificaciones de la pared celular

Es uno de los procesos de respuesta al déficit hídrico de los que menos

conocimientos se tiene. Lo que está cada vez más claro es que la pared celular no cumple una simple función pasiva, de soporte mecánico, en las células vegetales, sino que constituye un organelo que está continuamente respondiendo a los cambios en el desarrollo del organismo y a los estímulos medioambientales a través de las modificaciones en la naturaleza, abundancia y nivel de asociación de sus unidades estructurales: carbohidratos y proteínas. Esto va a determinar finalmente el grado de rigidez o extensibilidad de la pared, lo que va a permitir la regulación de procesos como la expansión celular, la diferenciación celular, la transducción de información sobre estímulos medioambientales y la conductividad hidráulica.

Está demostrado que los constituyentes de la pared celular se alteran durante los cambios en la tasa de crecimiento producidos por el desarrollo normal de los tejidos vegetales [Sadava y Chrispeels, 1973; Labavitch y Ray, 1974; Tanimoto e Igari, 1976; Stuart y Varner, 1980; Carpita y Gibeaut, 1993] o por estímulos medioambientales como el daño mecánico [Suzuki et al., 1993], la infección por patógenos y el tratamiento con elicitores [Bradley et al., 1992]. También se sabe que el estrés osmótico inhibe rápidamente el crecimiento de la región aérea de las plantas adultas y de las plántulas [Hsiao, 1973; Meyer y Boyer, 1981; Nonami y Boyer, 1989]. Ya que frecuentemente se ha podido verificar inhibición del crecimiento por déficit hídrico aún antes de registrarse una pérdida en el turgor celular, se sugiere que las modificaciones en la composición de la pared celular son las responsables de que se detenga la expansión celular [Nonami y Boyer, 1989 y 1990a; Iraki et al., 1989a y 1989b], probablemente debido a una disminución en la extensibilidad de la pared [Nonami y Boyer, 1990b]. En plantas de maíz sometidas a estrés osmótico se ha demostrado la reducción en la capacidad de extensión en las células de sus hojas [Chazen y Neumann, 1994] y de sus raíces [Neumann et al., 1994]. Iraki et al., (1989) muestran cómo células adaptadas a condiciones salinas dejan de liberar al medio fragmentos del polímero de xiloglucano, hecho que siempre precede a la expansión celular. Otras modificaciones asociadas al estrés osmótico son el aumento en la lignificación y lignosuberización del xilema y de la epidermis de la raíz [Azaizeh y Steudle, 1984; Cruz et al., 1992]. Recientemente se han reportado diversos genes y proteínas inducidos por estrés osmótico y que codifican para proteínas de la pared o para enzimas implicadas en su metabolismo (Tabla 3).

## 9. Transferasas de lípidos (LTPs)

Las transferasas no específicas de lípidos son proteínas solubles básicas de bajo peso molecular (9 KDa) capaces de unir grupos acilo y de catalizar *in-vitro* la transferencia de lípidos entre diferentes sistemas de membrana [Revisado en Kader, 1996]. Son proteínas muy abundantes presentes en la región aérea de las plantas. Su secreción a la pared celular y su gran acumulación en la epidermis de las hojas sugiere que participan en la síntesis de la cutícula (ver pg. 14) a través de la secreción y deposición de sustancias lipofílicas desde las células de la epidermis en expansión [Revisado en Kader, 1996]. Sin embargo las LTPs también se han inmunolocalizado en otros tejidos, como el tejido vascular, el mesófilo foliar y el parénquima de órganos florales. También se le adjudica un papel biológico en embriogénesis somática y zigótica, donde se ha postulado que participaría en la formación de una capa protectora en torno al embrión [Revisado en Kader, 1996]. Las LTPs están estructuralmente relacionadas con proteínas de defensa contra patógenos que se acumulan en las semillas, los inhibidores de  $\alpha$ -amilasas y de proteasas [Bernhard and Somerville, 1989; Kalla et al., 1994]. Molina et al., (1994, 1995) demostraron *in-vitro* que las LTPs son potentes inhibidores del crecimiento de hongos y bacterias fitopatógenas [Molina et al., 1993; García-Olmedo et al., 1995], probablemente a través de mecanismos de permeabilización de las membranas de los patógenos. Se sabe que la síntesis de cutina se estimula por infección de patógenos, así como la acumulación de algunas LTPs. Las LTPs participan en la aclimatación de las plantas a diversos agentes medioambientales (Tabla 4).

**Tabla 4:** genes de LTPs inducidos por factores medioambientales

ENZIMA	ESPECIE	INDUCIBILIDAD	REF.
LTP 3, 4, 5	Cebada	Patógenos	Molina y García-Olmedo, 1993
TSW12	Tomate	NaCl	Torres-Schumann et al., 1992
gbIts	Cebada	Frío	White et al., 1994
pLE16	Tomate	Sequía, ABA	Plant et al., 1991

## 10. Estréses secundarios asociados al déficit hídrico: daño oxidativo e infección por patógenos

El daño oxidativo es un estrés inexorablemente asociado en las plantas al déficit hídrico (ver pg. 8). Se ha reportado la inducción por sequía de la actividad de enzimas eliminadoras de intermediarios oxidantes tóxicos, como la

glutación reductasa y la superóxido dismutasa (SOD) [Mittler, 1994], así como la inducción transcripcional de los genes que codifican para una ascorbato peroxidasa [Mittler, 1994] y tres superóxidos dismutasas [Perl-Treves y Galun, 1991; White y Zilinskas, 1991; Zhu y Scandalios, 1994]. Se sabe además que existe protección cruzada entre el estrés oxidativo y el osmótico.

La presencia de especies reactivas de O<sub>2</sub> es un factor común entre diferentes condiciones de estrés abiótico y en la respuesta a patógenos y existen diversos reportes que describen la inducibilidad directa por déficit hídrico de genes relacionados con la defensa contra patógenos (Tabla 5).

**Tabla 5:** Genes de probables proteínas de defensa contra patógenos inducidos por estrés osmótico

ENZIMA	ESPECIE	INDUCIBILIDAD	REF.
Endoquitinasa de pared BLT4 P22 BnD22 Lipooxigenasa	Similares a inhibidores de proteasas	<i>Lycopersicon chilense</i>	Chen et al., 1994
		Cebada	Dunn et al., 1991
	Rábano	Deshidratación, NaCl	López et al., 1994
	Nabo	Deshidratación	Downing et al., 1992
	Soja	Dehidratación, herida, Jasmónico	Bell, 1991
Dihidro flavonol reductasa Similar a taumatina	Cowpea Tomate	Deshidratación NaCl	Luchi, 1996 King et al., 1988

Como ya mencionamos, las LTPs podrían tener como función *in vivo*, entre otras, la defensa contra hongos y bacterias fitopatógenos (ver atrás). Las endoquitinasas son proteínas que se secretan a la pared celular para degradar la pared de hongos fitopatógenos. Los inhibidores de proteasas se acumulan normalmente en las semillas de las plantas para prevenir su ingestión por otros organismos. La enzima lipooxigenasa participa en la síntesis de la fitohormona ácido jasmónico (JA), que media la respuesta de las plantas a daño mecánico e infección por patógenos. La osmotina constituye una familia génica que codifica para unas proteínas básicas de bajo peso molecular que constituyen el polipéptido más abundante en células de tabaco adaptadas a NaCl o estrés osmótico (hasta el 12% de la proteína total). Los genes que codifican para estos polipéptidos responden a una gran variedad de estreses medioambientales, como deshidratación, estrés osmótico, salinidad, frío, daño mecánico e infección por organismos patógenos. Diversos miembros de esta familia de proteínas han sido localizados en cuerpos de inclusión vacuolares, membrana plasmática, tonoplasto y pared celular. Ensayos *in-vitro* con proteína purificada han demostrado su actividad contra el crecimiento de hifas y la germinación de esporas de hongos fitopatógenos. Se desconoce la función o funciones precisas

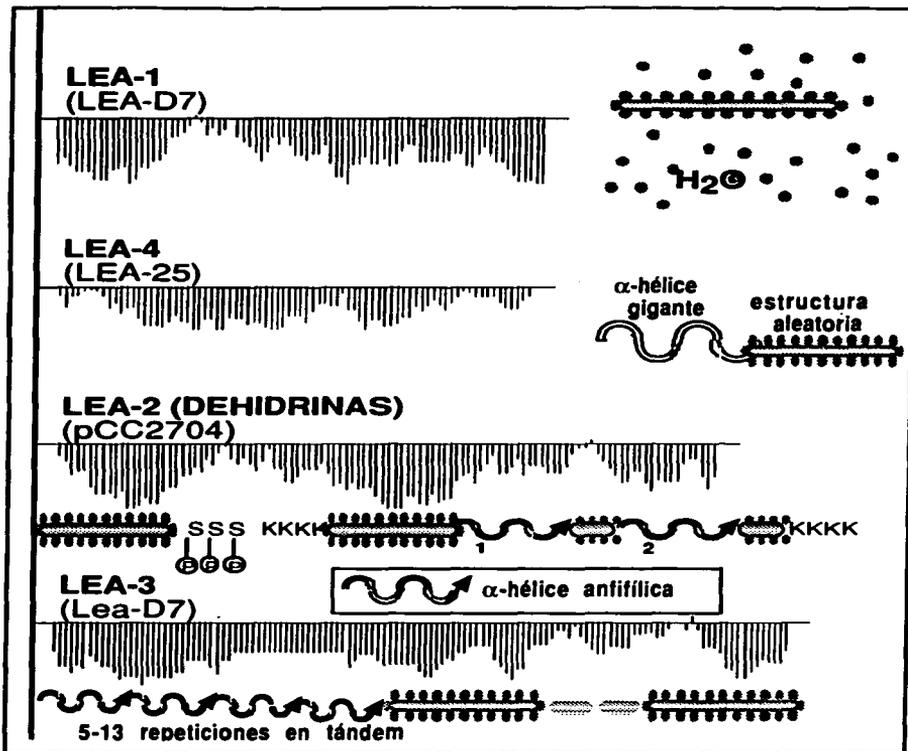
de la osmotina *in vivo* durante la adaptación de las plantas al estrés osmótico. Aunque la protección contra patógenos oportunistas es una posibilidad muy probable, no se descarta la implicación de estas proteínas en otros procesos celulares [Kononowicz et al., 1993].

## 11. Proteínas abundantes de la embriogénesis tardía (LEAs)

Son varias familias de proteínas que se acumulan en altos niveles durante la etapa tardía de la embriogénesis, justo antes del inicio de la desecación de la semilla, así como en respuesta a estrés osmótico en los tejidos vegetativos a través de mecanismos mediados por la hormona ABA [Revisado en Dure III, 1993]. Las LEAs son proteínas altamente hidrofílicas (Fig. 6) ricas en glicina y en aminoácidos cargados, caracterizadas por no tener una estructura globular y ser, por lo tanto, resistentes a la coagulación por efecto de las altas temperaturas. Es característico que, por lo general, carecen de cisteínas y de triptófanos [Revisado en Dure III, 1993]. Las proteínas LEAs se agrupan en varias familias de acuerdo a la homología en sus secuencias de aminoácidos:

- Familia D-19 (grupo 1): Proteínas de bajo peso molecular altamente homólogas (en torno al 65% de identidad y 80% de similaridad entre mono y dicotiledóneas). Muy ricas en glicinas (16-21%), que se encuentran dispersas a lo largo de toda la proteína, lo que les confiere gran flexibilidad y favorece que no adopten estructura secundaria ( $\alpha$ -hélice o  $\beta$ -plegada) (Fig. 6). [Revisado en Dure III, 1993].

- Familia D-113 (grupo 4): Poseen un rango muy variable de tamaño (88-175 aminoácidos), son ricas en glicinas y treoninas y, a diferencia de las otras familias, son muy ricas en alaninas (11-20%). Según las predicciones, poseen siempre un dominio conservado de unas 60-80 aminoácidos con estructura prácticamente ininterrumpida  $\alpha$ -hélice. El resto de la proteína, una región de estructura aleatoria, está poco conservada y varía mucho en tamaño entre los diferentes componentes de la familia. Las proteínas de algodón pertenecientes a estas familias están distribuidas homogéneamente por todas las células del embrión en una concentración de 0.3 mM [Revisado en Dure III, 1993].



**Fig. 6:** Esquema del perfil hidropático y de de la estructura de las diversas familias de proteínas LEA. Las líneas apiladas por debajo del eje representan aminoácidos hidrofílicos. Las barras anchas representan tramos de polipéptidos donde domina la estructura aleatoria, y los círculos representan moléculas de agua.

- **Familia D-11 (grupo 2, o dehidrinas):** Son también muy hidrofílicas, de tamaños muy variables (14-150 KDa) y poseen diversos motivos característicos representados diferencialmente entre las distintas proteínas de

la familia (Fig. 6): i) regiones interdispersas ricas en glicina y treonina con predicción de estructura aleatoria; ii) entre 1-3 motivos repetidos en tandem de 14 aminoácidos de secuencia bastante conservada que se estructuran como  $\alpha$ -hélices anfífilas y que están presentes generalmente en el extremo carboxilo de la proteína; iii) tracto de 6-9 serinas fosforilables contiguas que están seguidas por una región rica en aminoácidos cargados positivamente (principalmente lisinas) [Revisado en Close, 1993]. Goday et al., (1994) demostraron que la región de serinas fosforilables se trata de un motivo presente en proteínas que se unen a otras proteínas para acarrearlas al núcleo. Dicho motivo es el que reconoce la señal de localización nuclear en las proteínas que son transportadas al núcleo [Goday et al., 1994]. Las dehidrinas representan alrededor del 0.5% de la proteína total soluble de un embrión.

Familia D-7, grupo 3: Caracterizadas principalmente por la presencia de 11-meros conservados y repetidos en tándem un número variable de veces (entre 5 y 13). Esto hace que los miembros de esta familia tengan tamaños muy diferentes. Como en el caso de las dehidrinas, estos motivos están muy conservados y constituyen  $\alpha$ -hélices anfífilas. Estudios de predicción de estructura concluyeron que dos 11-meros pueden dimerizar en una estructura helicoidal dextrógira. También se encuentran uniformemente distribuidos en embriones de algodón en una concentración estimada de 0.34 mM, lo que supone el 4% de la proteína citosólica no organelar [Revisado en Dure III, 1993a].

La función biológica de estas proteínas se desconoce. Se ha sugerido que su conformación abierta, no globular, y su gran gran hidrofobicidad, les proporciona una gran capacidad para interactuar con el agua [McCubbin y Kay, 1985]. Se propone entonces que favorecerían la retención de agua en tejidos vegetativos sujetos a estrés osmótico y prevendrían la pérdida completa de agua en los embriones, creando ambientes de hidratación que protegerían a las macromoléculas y a las estructuras celulares. Otra función postulada es la de detoxificación mediante el secuestro de iones. Estas proteínas parecen muy características de las plantas superiores, y hasta la fecha no se han reportado miembros de estas familias génicas en otros organismos. A dos proteínas LEA se les ha comprobado un papel funcional en la adquisición de tolerancia al estrés osmótico: HVA1, una LEA del grupo 3 de cebada, y LE25, una proteína LEA del grupo 4 de tomate. La sobreexpresión de HVA1 en arroz aumenta su resistencia a deshidratación y salinidad [Xu DP et al. 1996]. El gen LE25 sobreexpresado en levadura aumenta su resistencia a salinidad y congelamiento [Imai et al. 1996]. Sin embargo, se desconocen los mecanismos moleculares que desarrollan las proteínas LEA para aumentar la tolerancia de las plantas al déficit hídrico.

**LEAs atípicas:** Se trata de las LEA5 y LEA14 de algodón, y proteínas relacionadas en otras especies. A diferencia de otras LEAs, ambas se acumulan abundantemente en las hojas de plantas estresadas. Las llamamos atípicas porque no pertenecen a ninguna de las familias descritas y no presentan el grado de hidrofiliicidad ni la composición general de aminoácidos que caracteriza a las LEAs (Fig.7) [Galau et al., 1993]. La **LEA5** de algodón es una proteína de 11,4 Kda con dominios hidrofóbicos en la región amino terminal que podría ser una señal de tránsito al retículo endoplásmico [Jackson et al., 1997]. El resto de la proteína es hidrofílica. No es rica en glicinas pero sí en serinas (casi 15%) [Galau et al., 1993]. La proteína **LEA14**, también de algodón, es la otra versión de LEA atípica pues es moderadamente hidrofóbica en casi toda su extensión y tampoco es rica en glicinas. [Galau et al., 1993]. En la literatura se pueden encontrar reportes de proteínas homólogas a estas LEAs y que se inducen por otros procesos diferentes a la deshidratación. En el caso de la LEA5 hay homólogas con genes inducidos por auxina [Yamamoto et al., 1992], por ácido giberélico en hojas, por choque térmico, metales pesados y por tuberización (también en hojas) [Jackson et al., 1997]. La LEA14 es casi idéntica a una proteína, Lemmi9, que se induce en las agallas generadas por la infección de nematodos en raíces de tomate, y no por sequía [Van der Eycken et al., 1997].

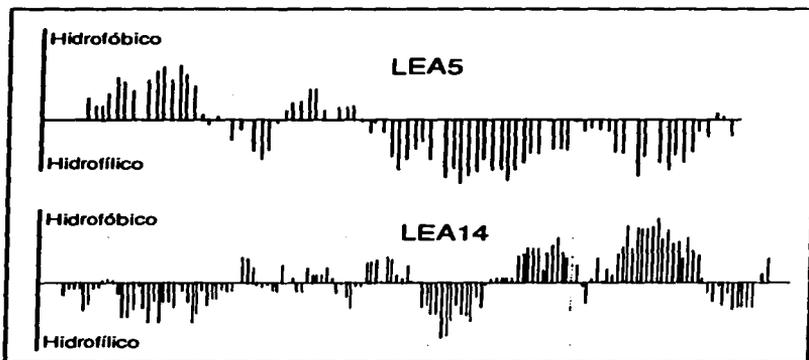


Fig. 7: Perfil hidropático de las LEAs atípicas 5 y 14. Nótese la mayor abundancia de regiones hidrofóbicas en estas proteínas

## 12. Otros genes/proteínas inducidos por estrés osmótico

En la Tabla 6 describimos algunos genes más reportados en la literatura como de respuesta a estrés osmótico. Se desconoce la función adaptativa de los productos de estos genes en la respuesta de la planta al déficit hídrico.

**Tabla 6:** genes de función desconocida inducidos por estrés osmótico

GEN	PROTEINA	ESPECIE	FUCION HIPOTETICA	INDUCIBILIDAD	REF.
—	Indol butirato-sintetasa	Maiz	?	Osmótico, ABA	Ludwing-Muller, 1995
rd19A y 21A	Homólogo. cys-proteasa	<i>A. thaliana</i>	Metabolismo de pared celular.	Deshidratación, NaCl	Koizumi, 1993
btg26	Homólogo. deshidrogenasa	<i>B. Napus</i>	Biosíntesis de osmolito	Deshidratación, NaCl frío, ABA, calor	Stroeher, 1995
sdi	Aminociclopropano carboxilato oxidasa	Girasol	?	Deshidratación, ABA	Ouvrad, 1996
cAtSEH	Epóxido hidrolasa soluble	<i>A. thaliana</i>	?	Deshidratación, auxina	Kiyosue, 1994
ERD11 y 13	Glutatión transferasa	<i>A. thaliana</i>	Antioxidante	Deshidratación	Kiyosue, 1993
T151	Homólogo. gen específico de fase S	<i>O.sativa</i>	Regulación del ciclo celular	Deshidratación, frío, anoxia, callos	Kidou, 1994
MA16	Proteína de unión a ARN	Maiz	Procesamiento del pre-rRNA o ensamblaje de ribosomas en estrés	Deshidratación	Alba, 1994
HVD1	Posible helicasa de ARN	Cebada	Estabilizador de ARNm en estrés	NaCl, frío	Nakamura, 1997
BD8	Nucleasa	Cebada	Alteración de la expresión genética o movilizador de grupos P en estrés	NaCl	Muramoto, 1997
Asr1	Proteína de unión a ADN	Tomate	?	Osmótico, NaCl, ABA	Amitai-Zeigerson, 1995
DS2	Híbrido LEA/Asr1	<i>S. chacoense</i>	Osmoprotector nuclear	Deshidratación	Sihavy, 1995
Kin1 Kin2	Homólogo. proteína de anticongelamiento	<i>A. thaliana</i>	Crío/osmoprotección	frío, ABA	Kurkela, 1992
—	Proteína filakoidal cosp34	Patata	Protección del aparato fotosintético	Deshidratación	Pruvot, 1996

Tabla 6 (continuación)

GEN	PROTEÍNA	ESPECIE	FUNCION HIPOTETICA	INDUCIBILIDAD	REF.
MsacA pUM90-1 pSM2075		Alfalfa <i>M. sativa</i> <i>M. sativa</i>	Familia de genes de función desconocida	ABA, frío, deshidratación y otros estreses mediambientales	Laberge, 1993 Luo, 1992 Luo, 1991
pBN115 pBN26 pBN19 COR15		Nabo Nabo Nabo <i>A. thaliana</i>	Protectores contra daños por frío o congelamiento	Frío, deshidratación	Weretilnyk, 1993
ti65 ti78		<i>A. thaliana</i>	Protectores contra el frío	Frío, deshidratación	Nordin, 1993
RD22	Proteína de semilla	<i>A. thaliana</i>		ABA, deshidratación	Iwasaki, 1995
SalT		<i>O. sativa</i>		NaCl, deshidratación	Claes, 1990
pcC1326		<i>C. plantagineum</i>		Deshidratación	Piatkowski, 1990

Para que la célula vegetal pueda acumular las proteínas que le van a permitir desarrollar los mecanismos de tolerancia a la deshidratación antes descritos, se debe producir la siguiente sucesión de eventos:

- 1.- Percepción de uno o varios tipos de estímulos específicos ligados al estrés osmótico.
- 2.- Transducción y amplificación de la señal.
- 3.- Activación del conjunto de genes implicados en la respuesta al estrés.

### **1. Percepción del estrés**

Hay varios posibles estímulos por los que una célula vegetal puede medir la pérdida de agua de su interior [Bray, 1997]:

- \* Disminución o pérdida del turgor celular.
- \* Disminución del volumen celular o del área de la membrana plasmática.
- \* Pérdida de la tensión ("stretch") de membrana.
- \* Disminución del potencial hídrico u osmótico (aumento de la concentración de los solutos intracelulares).
- \* Alteración de conexiones presentes entre la pared celular y la membrana plasmática.

En plantas se desconocen hasta la fecha los estímulos y los mecanismos precisos de su detección. Se ha descrito un canal de cationes mecanosensor selectivo a calcio en células epidérmicas de cebolla. El canal es activable por tensión y es sensible a un herbicida perturbador del citoesqueleto. Los autores proponen que podría servir para transducir las modificaciones producidas en la interacción membrana-pared durante eventos como el cambio de turgor o la expansión celular [Ding y Pickard, 1993]. En *A. thaliana* se ha encontrado un gen homólogo a *Sln1P*, un gen de levadura que participa en un sistema osmosensor de dos componentes [revisado en Bray, 1997]. En los sistemas de dos componentes de procariontes, una molécula percibe un estímulo medioambiental y activa un dominio histidina-cinasa, lo que da lugar a la fosforilación de un residuo de histidina presente en dicho dominio. Este grupo fosfato se transfiere a un residuo aspartato presente en el dominio receptor de una segunda molécula encargada de transducir la señal. El sistema de dos componentes de levadura está compuesto por tres proteínas (*Sln1P*, *Ypd1* y *SsK1P*) [Maeda et al., 1994] que desarrollan un mecanismo de fosforilación conocido como 'fosforelevo' ('phosphorelay'), diferente al de las cascadas de amplificación de señal. Es un mecanismo de fosforilación de cuatro pasos, His-Asp-His-Asp, que parece ser mucho más severo en su control por

tener múltiples puntos de decisión y/o una forma de integrar información adicional procedente de otras vías de transducción de señal [Appleby et al., 1996]. Este osmosensor, y otro más, constituido por una proteína de membrana plasmática activable por alta osmolaridad, Sholp, regulan una cascada de fosforilación por MAP cinasa conocida como la vía HOG [revisado en Bray, 1997]. Un modelo atractivo de percepción de estímulo mediambiental es el de la respuesta a choque térmico en levadura. Kamada et al., (1995) sugieren que el estímulo en el caso de la respuesta a calor es el aumento de la fluidez de la membrana.

## **2. Transducción de señal**

Se sabe que no todos los genes de respuesta a estrés osmótico se inducen bajo las mismas condiciones o en los mismos tipos celulares, por lo que parece haber diferentes mecanismos de señalización. Una de las señales más importantes que operan durante el déficit hídrico es la fitohormona ABA (pg. 10 de este Cap.) que induce, aunque no todos, los genes de respuesta a estrés osmótico.

### **2.1. Percepción de ABA**

La fitohormona ABA es un sesquiterpeno derivado del mevalonato que se sintetiza a través de la vía de biosíntesis de los carotenoides. El corte de 9'-cis-neoxantina da lugar al intermediario xantoxina, que es oxidado a ABA-aldehído y convertido en ABA con la enzima ABA-aldehído oxidasa. ABA regula la maduración (deseccación y dormancia) del embrión, la germinación y la respuesta de los tejidos vegetativos al estrés osmótico. Se ha comprobado que en tejidos vegetativos sujetos a estrés osmótico aumentan los niveles de ABA (deseccación, salinidad o frío), y que el punto de la ruta metabólica que parece estar regulado por estrés es el corte de 9'-cis-neoxantina. Además, la aplicación de ABA a tejidos no estresados mimifica en las plantas muchas de las respuestas fisiológicas y moleculares del déficit hídrico [Bray et al., 1993]. No se conoce la forma en que ABA es reconocida por la célula vegetal, aunque hay evidencia de que puede ser reconocida dentro y fuera de la célula y de que hay múltiples receptores para ABA en base a datos obtenidos sobre la respuesta de genes frente a análogos estructurales de ABA [revisado en Bray, 1997].

### **2.2. Transducción de la señal de ABA**

Los datos que se tienen sobre este punto indican que la señal de ABA incluye al menos una cascada de proteínas cinasa/fosfatasa que a su vez interacciona con señales de  $Ca^{++}$  intracelular, aunque aún faltan elementos de la vía para que puedan integrarse los diferentes pasos de la cascada. Los datos que más luz han arrojado en este aspecto son los derivados de los diversos tipos de

mutantes de plantas afectadas en la sensibilidad a ABA (mutantes *abi*). Un mutante de *Arabidopsis*, *abi1*, permitió aislar el gen *ABI1* y comprobar que codifica para un polipéptido con un dominio fosfatasa 2C en la región carboxilo, y un dominio de unión a  $Ca^{++}$  similar al 'EF-hand' en el extremo amino, por lo que se sugiere que la proteína *ABI* es una fosfoproteína fosfatasa activable por  $Ca^{++}$ . Otro de los datos que involucra al  $Ca^{++}$  en la transducción de la señal de ABA es que durante el cerrado del estoma, inducido por la acción de ABA en las células guarda, se produce un rápido aumento del  $Ca^{++}$  libre en el citosol junto con una variación en el pH. En las células de la aleurona de la semilla se ha comprobado que la señal de ABA está mediada por una MAP ('mitogen activated phosphate') cinasa. Otro elemento implicado en la cascada de ABA es una proteína farnesil transferasa, que podría catalizar la modificación (localización en la membrana plasmática) de un receptor o de un componente de la señal de ABA [revisado en Bray, 1997]. El gen *ABI3* se aisló por clonación posicional y se vió que la proteína deducida de su secuencia posee regiones discretas con alta similaridad con el factor transcripcional de maíz *viviparous-1*, regulador de la producción de antocianinas en la semilla [Giraudat et al., 1992].

### 2.3. Otros elementos posiblemente implicados en la transducción del estrés osmótico

Durante la caracterización que múltiples laboratorios realizan sobre clones de ADNc de plantas correspondientes a genes que responden a estrés osmótico, han aparecido genes que codifican para proteínas homólogas a transductores de señal conocidos: dos genes que codifican para cinasas dependientes de  $Ca^{++}$  y que se inducen por deshidratación en *A. thaliana*; un gen que responde a ABA y a deshidratación y que codifica para una Ser-Thr-cinasa en trigo [revisado en Ingram y Bartels, 1996]; y genes que codifican para una MAP-cinasa, una MAP-cinasa-cinasa-cinasa y una proteína ribosomal S6-cinasa que se inducen por contacto mecánico, frío y déficit hídrico en *A. thaliana* [Mizoguchi et al., 1996]. Además de esto, un transcrito que codifica para una fosfolipasa C específica de fosfatidil inositol aumenta durante deshidratación en *A. thaliana*. Esta enzima está implicada en la síntesis de inositol 1,4,5-trifosfato, que estimula la liberación de  $Ca^{++}$  de los sitios donde se almacena intracelularmente [Hirayama et al., 1995]. Este tipo de proteínas son del mismo tipo que las que señalizan estímulos medioambientales en animales y su inducibilidad indicaría que estas vías se potencian durante el estrés hídrico. Una probable fuente valiosa de genes que participan en la señalización de la pérdida de turgor celular en plantas la encontramos en el banco de mutantes generado por Ishitani et al., (1997). Ellos obtuvieron 400,000 líneas mutantes de plantas de *A. thaliana* transformadas con un gen quimérico que consiste en un promotor que responde a estrés osmótico fusionado a la

región codificante del gen de la luciferasa (*luc*). Con esta estrategia han aislado tres grupos de mutantes: i) aquéllos que expresan *luc* constitutivamente en ausencia de estrés; ii) aquéllos que son hipersensibles a osmolaridad; y iii) aquéllos que son poco sensibles a osmolaridad

### 3. Activación de genes

Hasta la fecha se han caracterizado dos tipos de elementos en los promotores de los genes que responden a estrés osmótico en las plantas: el elemento de respuesta a ABA (ABRE) y sus asociados, y el elemento de respuesta a deshidratación independiente de ABA (DRE) (también conocido como 'C-repeat') [revisado en Ingram y Bartels, 1996 y Bray, 1997].

#### 3.1. Respuesta asociada a ABRE

ABRE es el elemento en *cis* mejor caracterizado en la respuesta a estrés osmótico. Su secuencia consenso es:

RCACGTGGYR

donde 'R' representa una base púrica e 'Y' una base pirimidínica. Contiene el motivo palindrómico CACGTG que incluye elemento central ACGT. Se ha demostrado que el elemento ACGT participa en la regulación de la expresión de genes a través de ABA en numerosas especies, aunque también está presente en otros elementos regulatorios, como la caja-G, implicada en la expresión de genes regulados por luz, auxina, JA y SA. La orientación del elemento ABRE no afecta a la transcripción, lo que sugiere que más bien funcionan como potenciadores ('enhancers') de la transcripción. Se ha demostrado que los nucleótidos que flanquean al elemento central de la caja ABRE pueden ser importantes para la regulación de la respuesta. Aunque la presencia de este elemento es suficiente en muchos genes para su expresión a través de ABA, en otros genes se han caracterizado elementos adicionales en *cis* que complementan a ABRE en la regulación. Se trata de los elementos de ajuste ('coupling elements'):

\* Elemento CE1 ( TGCCACCG ) necesario junto con ABRE para la regulación por ABA del gen HVA22 de cebada

\* Elemento CE3 ( ACGGTGTCCTC ) en el gen HVA1 de cebada. CE3 y CE1 no son adecuadamente intercambiables, lo que indica que están implicados en la especificación de la respuesta a través de la unión de diferentes factores de transcripción. De hecho el factor transcripcional VP1 tiene un efecto sinérgico con ABA en la expresión de HVA1, pero no en la expresión de HVA22.

\* Elemento QS2 en el gen  $\alpha$ -amilasa de cebada aumenta la respuesta

del elemento ABRE a través de ABA.

Los factores en trans que hasta la fecha se han caracterizado como de unión a elementos ABRE son EMBP-1 de trigo y TAF-1 de tabaco. Las secuencias de aminoácidos de ambas proteínas muestran un dominio básico adyacente a un motivo de 'cremallera de leucinas'. ABI3, homólogo a VP1, se ha demostrado como necesario para la expresión de ciertos genes de *Craterostigma* dependientes de ABA.

### 3.2. Respuesta asociada a DRE

Es un elemento que media la expresión de genes de respuesta a estrés osmótico de forma independiente a ABA. Su secuencia en el gen *rd29A* de *Arabidopsis* es ( TACCGACAT ). Recientemente se ha caracterizado el gen que codifica para el factor transcripcional CBP1, que se une al elemento DRE (Thomashow et al., 1997).

### 3.3. Otros elementos de respuesta a estrés osmótico

\* El elemento ( CACATG ) (similar al elemento donde se une el factor MYC) está presente en el gen *rd22* de *Arabidopsis* .

\* El elemento ( AGCCC ) está presente en el gen CDeT27-45 de *C. plantagineum*, y es necesario, pero no suficiente para la expresión regulada por ABA.

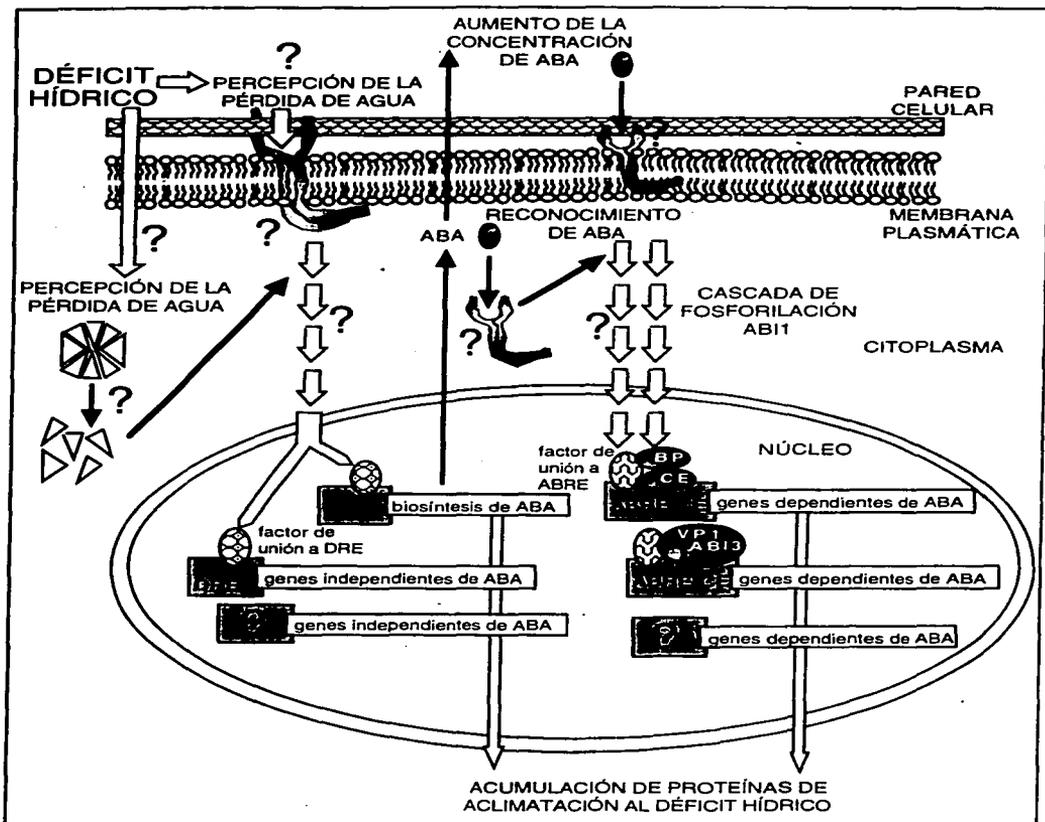
\* El elemento ( CGTGTCGTCCATGCAT ), similar al elemento de ajuste CE3 y presente en el gen C1 de maíz, es necesario y suficiente para la expresión regulada por ABA [revisado en Ingram y Bartels, 1996 y Bray, 1997].

### 3.4. Otros posibles factores transcripcionales

El gen *Atmyb2* responde a deshidratación, NaCl y ABA en *A. thaliana*, y codifica para una proteína relacionada a los reguladores MYB. Se ha comprobado que la proteína ATMYB2 se une al elemento ( PyAACTG ), al que se sabe que se unen los factores MYB. El gen *rd22* de respuesta a sequía en *A. thaliana* no posee elementos ABRE ni DRE, pero poseen dos sitios de reconocimiento para los factores MYC y MYB respectivamente [revisado en Ingram y Bartels, 1996]. También se han reportado en *Craterostigma* genes homólogos a *Atmyb2* y que se inducen en respuesta a deshidratación y tratamiento con ABA [Iturriaga et al., 1996].

Existen órdenes superiores de control prácticamente desconocidos y que probablemente juegen un importante papel: en la regulación de la expresión génica en la planta, como puede ser la topología del ADN. Se sabe por ejemplo que la actividad de unión de los factores bZIP y EmBP-1 al elemento

**ABRE del gen *Em* de trigo depende de la posición nucleosomal [revisado en Bray, 1997]. En la Fig. 8 mostramos un esquema de los principales protagonistas caracterizados en la respuesta de las células vegetales al déficit hídrico.**



**Fig. 8:** Regulación de la respuesta celular al déficit hídrico. La señal de deshidratación es sensada por la célula intra o extracelularmente, es transducida e inicia la activación de genes. Se produce un aumento de los niveles de ABA en los tejidos vegetales que induce otra vía de señalización que culmina con la activación de los genes dependientes de ABA. Los signos de interrogación indican los aspectos menos conocidos de la vía regulatoria.

## **V. USO DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR PARA LA OBTENCIÓN DE ORGANISMOS MÁS RESISTENTES AL ESTRÉS OSMÓTICO**

Algunas de las estrategias que desarrollan las plantas u otros organismos para adquirir mayor tolerancia al estrés osmótico (sección IV) son fácilmente manipulables por las técnicas de biología molecular dado que pocos o, en ocasiones, un sólo gen están implicado en el desarrollo del proceso en cuestión. En la Tabla 7 describimos los casos reportados de sistemas transgénicos en los que se ha conseguido mejorar la tolerancia de un organismo frente a algún tipo de estrés osmótico. Por lo general, el grado de mejora en la tolerancia al estrés en las plantas transgénicas ha sido bajo o moderado, y no ha sido evaluado en el campo. Estos hallazgos no se han aplicado aún al desarrollo agrícola, aunque el avance de la investigación en este terreno hará posible en un futuro cercano la mejora de la capacidad de tolerancia de especies agrícolas al déficit hídrico. Probablemente será necesario regular la expresión de los genes transformados para no afectar el rendimiento de las cosechas, así como combinar más de un gen para conseguir que la mejora de diversas estrategias de adaptación al estrés tengan un efecto sinérgico en la adquisición de la tolerancia.

**Tabla 7:** Descripción de sistemas transgénicos transformados con genes implicados en la tolerancia a estrés osmótico

GEN/PROTEÍNA	ESPECIE TRANSFORMADA	PRODUCTO ACUMULADO	FENOTIPO	REF.
Manitol 1 fosfato deshidrogenasa procaríota	Tabaco	Manitol	Mayor tolerancia a NaCl	Tarczynski, 1993
Manitol 1 fosfato deshidrogenasa procaríota	<i>A. thaliana</i>	Manitol	Mejor germinabilidad en NaCl	Thomas, 1995
Manitol 1 fosfato deshidrogenasa procaríota	Tabaco	Manitol en cloroplasto	resistencia a estrés oxidativo: mayor retención de clorofila y capacidad fotosintética	Richard, 1997
Betaín aldehído deshidrogenasa de <i>E. coli</i>	Cianobacteria	Glicín-betaína	Estabilización de la actividad fotosintética y mejor capacidad de crecimiento en NaCl	Nomura, 1995
$\Delta^1$ -pirrolin-5-carboxilato sintetasa de soja	Tabaco	Prolina	Mayor biomasa radicular y desarrollo floral en déficit hídrico	Kishor, 1995
Fructosil transferasa procaríota	Tabaco	Fructano (polifruktosa)	Mayor tolerancia a estrés osmótico generado con polietilén glicol	Pilon-Smits, 1995
Superóxido dismutasa de tabaco (SOD)	Alfalfa	Mn <sup>++</sup> -SOD	Mayor tolerancia a estrés por congelamiento	McKersie, 1993
Desaturasa de ácidos grasos bacteriana		La enzima aumenta los niveles de lípidos desaturados	Menor sensibilidad a frío	Murata, 1992
LEA del grupo 3 de cebada	Arroz	LEA del grupo 3	Mayor tolerancia a deshidratación y NaCl	Xu, 1996
LEA del grupo 4 de tomate	Levadura	LEA del grupo 4	Mayor tolerancia a NaCl y congelamiento	Imai, 1996
Omitina decarboxilasa de ratón	Zanahoria	Putrescina (poliamina)	Mayor tolerancia a deshidratación y NaCl	Minocha y Sun, 1997

## VI. BIBLIOGRAFÍA

- Alba, M.M., Culláñez-Macla, F.A., Goday, A., Freire, M.A., Nadal, B., and Pagés, M. (1994).** The maize RNA-binding protein, MA16, is a nucleolar protein located in the dense fibrillar component. *Plant J.* **6:** 826-834.
- Almoguera, C., Coca, M.A., and Jordano, J. (1993).** Tissue specific expression of sunflower heat shock proteins in response to water stress. *Plant J.* **4:** 947-58.
- Almoguera, C., and Jordano, J. (1992).** Developmental and environmental concurrent expression of sunflower dry-seed store low-molecular weight heat-shock-protein and leaf mRNAs. *Plant Mol. Biol.* **19:** 781-792.
- Amital-Zeigerson, H., Scolnik, P.A., and Bar-Zvi, D. (1995).** Tomato Asr1 mRNA and protein are transiently expressed following salt stress, osmotic stress and treatment with abscisic acid. *Plant Sci.* **110:** 205-213.
- Anandarajah, K., Kott, L., Beversдорf, W.D., and Mckerzie, B.D. (1991).** Induction of desiccation tolerance of microspore-derived embryos of *Brassica napus* L. by thermal stress. *Plant Sci.* **77:** 119-123.
- Appleby, J.L., Parkinson, J.S., and Bourret, R.B. (1996).** Signal transduction via the multi-step phosphorelay: not necessarily a road less traveled. *Cell* **86:** 845-848.
- Atkinson, B.D., Raizada, M., Bouchard, R.A., Frappier, J.R.H., and Waldem, B.D. (1993).** The independent stage specific expression of the 18-Kd heat shock protein genes during microsporogenesis in *Zea mays* L. *Devel. Genet.* **14:** 15-26.
- Azalzeh, H., and Steudle, E. (1984).** Effect of salinity in water transport of excised maize (*Zea mays* L.) roots. *Plant Physiol* **97:** 1136-1145.
- Baker, J., Steele, C., and Dure III, L. (1988).** Sequence and characterization of 6 Lea proteins and their genes from cotton. *Plant Mol. Biol.* **11:** 277-291.
- Bell, E., and Mullet, J.E. (1991).** Lipoxigenase gene expression is modulated in plants by water deficit, wounding, and methyl jasmonate. *Mol. Gen. Genet.* **230** 456-462:
- Bernhard, W., and Somerville, C.R. (1989).** Coidentity of putative amylase inhibitors from barley and finger millet with phospholipid transfer proteins inferred from amino acid sequence homology. *Arch. Biochem. Biophys.* **269:** 695-697.
- Besford, R.T., Richardson, C.M., Campos, J.L., and Tiburcio A.F. (1993).** Effect of polyamines on stabilization of molecular complexes in thylakoid membranes of osmotically stressed oat leaves. *Planta* **189:** 201-206.
- Bohnert, H.J., and Jensen, R.G. (1996).** Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. *TIBTECH* **14:** 89-97.
- Bohnert, H.J., Nelson, D.E., and Jensen, R.G. (1995).** Adaptation to environmental stresses. *Plant Cell* **7:** 1099-1111.

- Bond, U., and Schlesinger, M.J.** (1987). Heat shock proteins and development. *Adv. Genet.* **24** : 1-29.
- Bonham-Smith, P.C., Kapoor, M., and Beweley, J.D.** (1988). A comparison of the stress response in *Zea mays* seedlings as shown by qualitative changes in protein synthesis. *Can. J. Bot.* **66** : 1883-1890.
- Botella, M.A., Quesada, M.A., Konowicz, A.K., Bressan, R.A., Pilego, F., Hasegawa, P.M., and Valpuesta, V.** (1994). Characterization and *in situ* localization of a salt-induced tomato peroxidase mRNA. *Plant Mol. Biol.* **25**: 105-114.
- Boyer, J.S.** (1982). Plant productivity and environment. *Science* **218**: 443-448.
- Bradley, D.J., Kjellbom, P., and Lamb, C.J.** (1992). Elicitor and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell* **70**: 21-30.
- Bray, E.A.** (1997). Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci.* **2**: 48-54.
- Bray, E.A., Moses, M.S., Imai, R., Cohen, A., and Plant, A.L.**(1993). Regulation of gene expression by endogenous abscisic acid during drought stress. In *Plant responses to cellular dehydration during environmental stress*. T. J. Close and E. A. Bray, Eds. (Rockville, MD, Am. Soc. Plant Physiol.). pp. 167-176.
- Burke, J.J., Hatfield, J.L., Klein, R.R., and Mullet, J.E.** (1985). Accumulation of heat shock proteins in field-grown cotton. *Plant Phys.* **78**: 394-398.
- Carpenter, J.F., Crowe, L.M., and Crowe, J.H.** (1987). Stabilization of phosphofructokinase with sugars during freeze drying: characterization of enhanced protection in the presence of divalent cations. *Biochim. Biophys. acta* **923**: 109-115.
- Carpita, N.C., and Gibeaut, D.M.** (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* **3**: 1-30.
- Chazen, O., and Neumann, P.M.** (1994). Hydraulic signals from the roots and rapid cell-wall hardening in growing maize (*Zea mays* L.) leaves are primary responses to polyethylene glycol-induced water deficit. *Plant Physiol.* **104**: 1385-1392.
- Chen, R.D., and Tabaeizadeh, Z.** (1992). Expression and molecular cloning of drought induced genes in the wild tomato *Lycopersicon chilense*. *Biochem. Cell Biol.* **70**: 199-206.
- Chrispeels, M.J., and Maurel, C.**(1994). Aquaporins: the molecular basis of facilitated water movement through living plant cells? *Plant Physiol.* **105**: 9-13.
- Claes, B., Dekeyser, R., Villarroel, R., Van den Bulcke, M., and Bauw, G., et al.** (1990). Characterization of a rice gene showing organ-specific expression in response to salt stress and drought. *Plant Cell* **2**: 19-27.
- Close, T.J.** (1996). Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiol. Plant* **97**: 795-803.
- Close, T.J., Fenton, R.D., Yang, A., Asghar, R., and DeMason, D.A., et al.**(1993a).

- Dehydrin: the protein. In *Plant responses to cellular dehydration during environmental stress*. T. J. Close and E. A. Bray, Eds. (Rockville, MD, Am. Soc. Plant Physiol.). pp. 104-118.
- Close, T.J., and Lammers, P.J. (1993b). An osmotic stress protein from cyanobacteria is immunologically related to plant dehydrins. *Plant Physiol.* **101**: 773-779.
- Coca, M.A., Almoguera, C., and Jordano, J. (1994). Expression of sunflower low-molecular-weight heat-shock proteins during embryogenesis and persistence after germination: localization and possible functional implications. *Plant Mol. Biol.* **25**: 479-492.
- Cosgrove, D.J. (1996). Plant cell enlargement and the action of expansins. *Bioessays* **18**: 533-540.
- Covarrubias, A.A., Ayala, J.W., Reyes, J.L., Hernandez, M., and Garcíarrubio, A. (1995). Cell-wall proteins induced by water deficit in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Plant Physiol.* **107**: 1119-1128.
- Creelman, R.A., Mason, H.S., Bensen, R.J., Boyer, J.S., and Mullet, J.E. (1990). Water deficit and abscisic acid cause differential inhibition of shoot versus root growth in soybean seedlings. *Plant Physiol.* **92**: 205-214.
- Creelman, R.A., and Mullet, J. (1991). Water deficit modulates gene expression in growing zones of soybean seedlings. Analysis of differentially expressed cDNAs, a new  $\beta$ -Tubulin gene, and expression of genes encoding cell wall proteins. *Plant Mol. Biol.* **17**: 591-608.
- Crowe, J.H., Crowe, L.M., Carpenter, J.F., and Wistrom, C.A. (1987). Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochem. J.* **242**: 1-10.
- Crowe, J.H., Crowe, L.M., and Jackson, S.A. (1983). Preservation of structural and functional activity in lyophilized sarcoplasmic reticulum. *Arch Biochem. Biophys.* **220**: 477-484.
- Cruz, R.T., Jordan, W.R., and Drew, M.C. (1992). Structural changes and associated reduction of hydraulic conductance in roots of *Sorghum bicolor* L. following exposure to water deficit. *Plant Physiol* **99**: 203-212.
- Czarnecka, E., Nagao, R.T., Key, J.L., and Gurley, W.B. (1988). Characterization of Gmhsp26-A, a stress gene encoding a divergent heat shock protein of soybean: heavy metal-induced inhibition of intron processing. *Mol. Cell Biol.* **11**: 1113-1122.
- Deutch, C.E., and Winicov, I. (1995). Post-transcriptional regulation of a salt-inducible alfalfa gene encoding a putative chimeric proline-rich cell wall protein. *Plant Mol. Biol.* **27**: 411-418.
- Ding, J.P., and Pickard, B.G. (1993). Mechanosensory calcium-selective cation channels in epidermal cells. *Plant J.* **31**: 83-110.
- Downing, W.L., Mauxion, F., Fauvarque, M.O., Reviron, M.P., de Vienne, D., Vartanian, N., and Giraudat, J. (1992). A *Brassica napus* transcript encoding a protein related to the Kunitz protease inhibitor family accumulates upon water stress in leaves, not in seeds. *Plant J.* **2**: 685-693.
- Dunn, M.A., Hughes, M.A., Zhang, L., Pearce, R.S., Quigley, A.S., and Jack, P.L.

- (1991). Nucleotide sequence and molecular analysis of the low temperature induced cereal gene, BLT4. *Mol. Gen. Genet.* **229**: 389-394.
- Dure III, L. (1993a). Structural motifs in Lea proteins. In Plant responses to cellular dehydration during environmental stress. T. J. Close and E. A. Bray, Eds. (Rockville, MD, American Society of Plant Physiologists). pp. 91-103.
- Dure III, L. (1993b). A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. *Plant J.* **3**: 363-69.
- Esaka, M., Hayakawa, H., Hashimoto, M., and Matsubara, N. (1992). Specific and abundant secretion of a novel hydroxyproline-rich glycoprotein from salt-adapted winged bean cells. *Plant Phys.* **100**: 1339-1345.
- Espartero, J., Pintor-Toro, J.A., and Pardo, J.M. (1994). Differential accumulation of S-adenosylmethionine synthetase transcripts in response to salt stress. *Plant Mol. Biol.* **25**: 217-227.
- Espartero, J., Sánchez-Aguayo, I., and Pardo, J.M. (1995). Molecular characterization of glyoxalase-I from a higher plant; upregulation by stress. *Plant Mol. Biol.* **6**: 1223-1233.
- Feirer, R.P., and Carol, V. (1997). Effect of osmotic stress and UV light on arginine decarboxylase in *Arabidopsis*. The American Society of plant Physiologists. Abstract number 411.
- Galau, G.A., Wang, H.Y.C., and Hughes, D.W. (1993). Cotton *Lea5* and *Lea14* encode atypical late embryogenesis-abundant proteins. *Plant Physiol.* **101**: 695-696.
- García-Olmedo, F., Molina, A., Segura, A., and Moreno, M. (1995). The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. *Trends Microbiol.* **3**: 72-74.
- Giraudat, J., Hauge, B.H., Valon, C., Smalle, J., Parcy, F., and Goodman, H.M. (1992). Isolation of the *Arabidopsis AB13* gene by positional cloning. *Plant Cell* **4**: 1251-1261.
- Goday, A., Jensen, A., Culiáñez-Macià, F.A., Albà, M.M., Figueras, M., Serratos, J., Torrent, M., and Pagés, M. (1994). The maize abscisic acid responsive protein rab17 is located in the nucleus and cytoplasm and interacts with nuclear localization signals. *Plant Cell* **6**: 351-360.
- Godoy, J.A.e.a. (1994). Expression, tissue distribution and subcellular localization of dehydrin TASI4 in salt-stressed tomato plants. *Plant Mol. Biol.* **26**: 1921-1934.
- György, J., Gartner, A., Németh, H., Zoltán, M., Hirt, H., Herberle-Bors, E., and Dénes, D. (1991). Alfalfa heat shock genes are differentially expressed during somatic embryogenesis. *Plant Mol. Biol.* **16**: 999-1007.
- Hanson, A.D., and Hitz, W.D. (1982). Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. *Ann. Rev. Plant Physiol* **33**: 163-203.
- Hanson, A.D., Rathinasabapathi, B., Rivoal, J., Burnet, M., Dillon, M.O., and Gage, D.A. (1994). Osmoprotective compounds in the Plumbaginaceae: a natural experiment in metabolic engineering of stress tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* **91**: 306-310.
- Harrington, H.M., and Alm, D.M. (1988). Interaction of heat shock and salt shock in cultured tobacco cells. *Plant Physiol* **76**: 270-274.

- Helm, K.E., and Abernethy, R.H. (1990). Heat shock proteins and their mRNAs in dry and early embryos of wheat. *Plant Phys.* **93**: 1626-1633.
- Hirayama, T., Ohto, C., Mizoguchi, T., and Shinozaki, K. (1995). A gene encoding a phosphatidil-inositol specific phospholipase C is induced by dehydration and salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 3903-3907.
- Hong, J.C., Nagao, R.T., and Key, J.L. (1989). Developmentally regulated expression of soybean proline-rich cell wall protein genes. *Plant Cell* **1**: 937-943.
- Howarth, C. (1990). Heat shock proteins in *Sorghum bicolor* and *Pennisetum americanum* L. Stored RNA in sorghum during germination. *Plant Cell Envir.* **13**: 57-64.
- Hsiao, T.C. (1973). Plant responses to water stress. *Ann Rev. Plant Physiol.* **24**:
- Imai, R., and et al., e. (1996). A *lea*-class gene of tomato confers salt and freezing tolerance when overexpressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **170**: 243-248.
- Ingram, J., and Bartels, D. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**: 377-403.
- Iraki, N.M., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., and Carpita, N.C. (1989a). Alteration of the physical and chemical structure of the primary cell wall of growth limited plant cells adapted to osmotic stress. *Plant Physiol.* **91**: 39-42.
- Iraki, N.M., Singh, N., Bressan, R.A., and Carpita, N.C. (1989b). Cell walls of tobacco cells and changes in composition associated with reduced growth upon adaptation to water and saline stress. *Plant Physiol.* **91**: 48-53.
- Ishitani, M., Nakamura, T., Hans, S.Y., and Takabe, T. (1995). Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in barley in response to osmotic stress and abscisic acid. *Plant Mol. Biol.* **27**: 307-315.
- Ishitani, M., Xiong, L., Stevenson, B., and Zhu, J.K. (1997). Isolation of stress signal transduction mutants by luciferase imaging in *Arabidopsis thaliana*. *The American Society of plant Physiologists*. Abstract number 1378.
- Iturriaga, G., Leyns, L., Villegas, A., Gharaibeh, R., Salamini, F., and Bartels, D. (1996). A family of novel *myb*-related genes from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* are specifically expressed in callus and roots in response to ABA or desiccation. *Plant Mol. Biol.* **32**: 707-716.
- Iwasaki, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (1995). Identification of a cis regulatory region of a gene in *Arabidopsis thaliana* whose induction by dehydration is mediated by abscisic acid and requires protein synthesis. *Mol. Gen. Genet.* **247**: 391-398.
- Jackson, S., Gascón, J., Carrera, E., Monte, E., and Prat, S. (1997). Cloning and expression analysis of a gene that shows developmental regulation upon tuberization in potato. *Plant Mol. Biol.* **33**: 169-174.
- Jakob, U., Gaestel, M., Engel, K., and Buchner, J. (1993). Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J. Biol. Chem.* **268**: 1517-1520.

**Jia, Z., McCollough, N., Han, S.Y., and Takabe, T.**(1992). Gene amplification at a locus encoding a putative Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter confers sodium and lithium tolerance in fission yeast . EMBO J. 11 : 1631-1640.

**Jones, J.T., and Mullet, J.E.**(1995). A salt- and dehydration-inducible pea gene, Cyp15a, encodes a cell wall protein with sequence similarity to cysteine proteases. Plan Mol. Biol. 28: 1055-1065.

**Kader, J.C.** (1996). Lipid-transfer proteins in plants. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol. 47: 627-654.

**Kaldenhoff, R., Kölling, A., Meyers, J., Karmann, U., Ruppel, G., and Richter, G.** (1995). The blue light-responsive AthH2 gene of *Arabidopsis thaliana* is primarily expressed in expanding as well as in differentiating cells and encodes a putative channel protein of the plasmalemma. Plant J. 6: 187-199.

**Kalla, R., Shimamoto, K., Potter, R., Nielsen, P.S., Linnestad, C., and Olsen, O.A.** (1994). The promoter of the barley aleurone specific gene encoding a putative 7 kDa lipid transfer protein confers aleurone cell-specific expression in transgenic rice. Plant J. 6: 849-860.

**Kamada, Y., Jung, U.S., Piotrowski, J., and Levin, D.E.**(1995). The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisia* mediates a novel aspect of the heat shock response. Genes Dev. 9: 1559-1571.

**Katterman, F.** (1990). Environmental injury to plants. ()

**Kazuoka, T.y.O., K.** (1994). Purification and characterization of COR85-oligomeric complex from cold acclimated spinach. Plant Cell Physiol 35: 601-611.

**Keller, B.** (1993). Structural cell wall proteins. Plant Physiol. 101: 1127-1130.

**Kidou, S., Umeda, M., Tsuge, T., Kato, A., and Uchimiya, H.** (1994). Isolation and characterization of a rice cDNA similar to the S-phase-specific cyc07 gene. Plant Mol. Biol. 24: 545-547.

**King, G.J., Turner, V.A., Hussey, C.E., Wurtele, E.S., and Lee, S.M.**(1988). Isolation and characterization of a tomato cDNA clone which codes for a salt-induced protein. Plant Mol. Biol. 10: 401-412.

**Kishor, P.B.K., Hong, Z., Miao, G.H., Hu, C.A.A., and Verma, D.P.S.** (1995). Overexpression of  $\Delta$ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. Plant Physiol 108: 1387-1394.

**Kiyosue, T., Beetham, J.K., Pinot, F., Hammock, B.D., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K.** (1994). Characterization of an *Arabidopsis* cDNA for a soluble epoxide hydrolase gene that is inducible by auxin and water stress. Plant J. 6: 259-269.

**Kiyosue, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K.**(1993). Characterization of two cDNAs (ERD11 and ERD13) for dehydration-inducible genes that encode putative glutathione S-transferases in *Arabidopsis thaliana* L. FEBS Lett. 335: 188-192.

- Kiyosue, T., Yoshida, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (1996). A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline, but down regulated by dehydration in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **8**: 1323-1335.
- Kozumi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Tsuji, H., and Shinozaki, K. (1993). Structure and expression of two genes that encode distinct drought-inducible cysteine proteinases in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **129**: 175-182.
- Kononowicz, A.K., Raghothama, K.G., Casas, A.M., Reuveni, M., Watad, A.E.A., Liu, D., Bressan, R.A., and Hasegawa, P.M. (1993). Osmotin: Regulation of gene expression and function. In *Plant responses to cellular dehydration during environmental stress*. T. J. Close and E. A. Bray, Eds. (Rockville, MD, Am. Soc. Plant Physiol.). pp. 1441-158.
- Kurkela, S., and Borg-Franck, M. (1992). Structure and expression of *Kin2*, one of two cold- and ABA-induced genes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **19**: 689-692.
- Labavitch, J.M., and Ray, P.M. (1974). Relationship between promotion of xyloglucan metabolism and induction of elongation by indolacetic acid. *Plant Physiol.* **54**: 499-502.
- Laberge, S., Castonguay, Y., and Vézina, L.P. (1993). New cold- and drought-regulated gene from *Medicago sativa*. *Plant Physiol* **101**: 1411-1412.
- Lee, G.J., Pokala, N., and Vierling, E. (1995). Structure and *in vitro* molecular chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from pea. *J. Biol. Chem.* **270**: 10432-10438.
- Leone, A., Costa, A., Grillo, S., Tucci, M., Hovarth, I., and Vigh, K. (1996). Acclimation to low water potential determines changes in membrane fatty acid composition and fluidity in potato cells. *Plant Cell Environ.* **19**: 1103-1109.
- Levitt, J. (1980). Responses of plants to environmental stresses. In *Physiological Ecology*. T.T. Kozlowski, Eds. Academic Press). pp.
- Lindquist, S., and Craig, E.A. (1988). The heat shock proteins. *Ann. Rev. Genet.* **22**: 631-677.
- López, F., Vansuyrt, G., Fourcroy, P., and Casse-Delbart, F. (1994). Accumulation of a 22-KDa protein and its RNA in the leaves of *Raphanus sativus* in response to salt stress or water deficit. *Physiol. Plant.* **91**: 605-614.
- Luchi, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., and Shinozaki, K. (1996). Novel drought-inducible genes in the highly drought-tolerant cowpea: cloning of cDNAs and analysis of the expression of the corresponding genes. *Plant Cell Physiol* **37**: 1073-1082.
- Ludevid, D., Höfte, H., Himmelblau, E., and Chrispeels, M.J. (1992). The expression pattern of the tonoplast intrinsic protein  $\gamma$ -TIP in *Arabidopsis thaliana* is correlated with cell enlargement. *Plant Phys.* **100**: 1633-1639.
- Ludwig-Muller, J., Schubert, B., and Pieper, K. (1995). Regulation of IBA synthetase from maize (*Zea mays* L.) by drought stress and ABA. *J. Exp. Bot.* **46**: 423-432.
- Luo, M., Lin, L., Hill, R.D., and Mohapatra, S.S. (1991). Primary structure of an environmental stress and abscisic acid-inducible alfalfa protein.

- Luo, M., Liu, J.H., Mohapatra, S., Hill, R.D., and Mohapatra, S.S. (1992).** Characterization of a gene family encoding abscisic acid- and environmental stress-inducible proteins of alfalfa. *J. Biol. Chem.* 267: 15367-15374.
- Maeda, T., Wurgler-Murphy, S.M., and Saito, H. (1994).** A two-components system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* 369: 242-245.
- Marcus, A., Greenberg, J., and Averyhart-Fullard, V. (1991).** Repetitive proline-rich proteins in the extracellular matrix of the plant cell. *Physiol. Plant* 81: 273-279.
- McCubbin, W.D., and Kay, C.M. (1985).** Hydrodynamics and optical properties of the wheat Em protein. *Can. J. Biochem.* 63: 803-810.
- McKersie, B.D., Chen, Y., de Beus, M., Bowley, S.R., and Bowler, C. (1993).** Superoxide dismutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa. *Plant physiol.* 103: 1155-1163.
- Meyer, R.F., and Boyer, J.S. (1981).** Osmoregulation in soybean seedling having low water potentials. *Planta* 151: 482-489.
- Minocha, S.C., and Sun, D.Y. (1997).** Stress tolerance in plants through transgenic manipulation of polyamine biosynthesis. The American Society of plant Physiologists. Abstract número 1552.
- Mittler, R., and Zilinskas, B.A. (1994).** Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during progression of drought stress and following recovery of drought. *Plant J.* 5: 397-405.
- Mizoguchi, T., Irie, K., Hirayama, T., Hayashida, N., Yamaguchi-Shinozaki, K., Matsumoto, K., and Shinozaki, K. (1996).** A gene encoding a mitogen-activated protein kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and a S6 ribosomal protein kinase by touch, cold and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 765-769.
- Molina, A., Segura, A., and Garcia-Olmedo, F. (1993).** Lipid transfer proteins (nsLTP) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens. *FEBS Lett.* 316: 119-122.
- Mudgett, M.B., and Clarke, S. (1994).** Hormonal and environmental responsiveness of a developmentally regulated protein repair L-isoaspartyl methyltransferase in wheat. *J. Biol. Chem.* 269: 25605-12.
- Mundy, J., and Chua, N. (1988).** Abscisic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene. *EMBO J.* 7: 2279-2286.
- Muramoto, Y., Nakamura, T., and Takabe, T. (1997).** Isolation and characterization of a barley nuclease induced during salt stress. The American Society of plant Physiologists. Abstract number 543.
- Murata, N., Ishizaki-Nishizawa, O., Higashi, S., Hayashi, H., Tasaka, Y., and Nishida, I. (1992).** Genetically engineered alteration in the chilling sensitivity of plants. *Nature*

Murguia, J.R., Belles, J.M., and Serrano, R. (1995). A salt-sensitive 3', (2'), 5'-biphosphate nucleotidase involved in sulfate activation. *Science* 267: 232-234.

Nakamura, T., Muramoto, Y., and Takabe, T. (1997). Expression of a barley gene that encodes a putative ATP-dependent RNA helicase under salt stress. The American Society of plant Physiologists. Abstract number 544.

Neumann, P.M., Azaizeh, H., and Leon, D. (1994). Hardening of root cell walls: a growth inhibitory response to salinity stress. *Plan Cell Environ.* 17: 303-309.

Niogret, M.F., Culláñez-Macià, F.A., Goday, A., Albà, M.M., and Pagès, M. (1996). Expression and cellular localization of *rab28* mRNA and Rab28 protein during Maize embryogenesis. *Plant J.* 9: 549-557.

Niu, X., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., and Pardo, J.M. (1995). Ion homeostasis in NaCl stress environment. *Plant Physiol.* 109: 735-742.

Nomura, M., Ishitani, M., Takabe, T., Rai, A.K., and Takabe, T. (1995). *Synechococcus* sp. PCC7942 transformed with *E. coli* *bet* genes produces glycine betaine from choline and acquire resistance to salt stress. *Plant physiol.* 107: 703-708.

Nonami, H., and Boyer, J.S. (1990). Primary events regulating stem growth at low water potentials. *Plant Physiol.* 94: 1601-1609.

Nonami, H., and J.S., B. (1989). Turgor and growth at low water potentials. *Plant Physiol.* 89: 798-804.

Nordin, K., Vahala, T., and Palva, E.T. (1993). Differential expression of two related, low temperature-induced genes in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Mol. Biol.* 21: 641-653.

Nover, L., Scharf, K.D., and Neumann, D. (1989). Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of mRNAs. *Mol. Cell Biol* 9: 1298-1308.

Oliver, M.J. (1991). Influence of protoplasmic water loss on the control of protein synthesis in the desiccation tolerant moss *Tortula ruralis*. *Plant Phys.* 97: 1430-1434.

Ouvrad, O., Cellier, F., Ferrare, K., Tusch, D., Lamaze, T., Dupuis, J.M., and Casse-Delbart, F. (1996). Identification and expression of water stress- and abscisic acid-regulated genes in a drought-tolerant sunflower genotype. *Plant Mol. Biol.* 31: 819-829.

Peri-Treves, R., and Calun, E. (1991). The tomato Cu<sup>++</sup>, Zn<sup>++</sup> superoxide dismutase genes are developmentally regulated and respond to light and stress. *Plant Mol. Biol.* 17: 745-60.

Piatkowski, D., Schneider, K., Salamini, F., and Bartels, D. (1990). Characterization of five abscisic acid-responsive cDNAs isolated from the desiccation-tolerant plant *Craterostigma plantagineum* and their relationship to other water-stress genes. *Plant Physiol.* 94: 1682-1688.

Pilon-Smits, E.A.H., Ebskamp, M.J.M., Paul, M.J., Jeuken, M.J.W., Weisbeek, P.J., and Smeekens, S.C.M. (1995). Improved performance of transgenic-fructan accumulating tobacco under drought stress. *Plant Physiol.* 107: 125-130.

- Plant, A.L., Cohen, A., Moses, M.S., and Bray, E.A.**(1991). Nucleotide sequence and spatial expression of a drought- and abscisic acid-induced gene of tomato. *Plant Physiol* **97**: 900-906.
- Pruvot, G., Culiné, S., Pettier, G., and Rey, P.**(1996). Characterization of a novel drought-induced 34KDa protein located in the thylakoids of *Solanum tuberosum* L. plants. *Planta* **198**: 471-479.
- Ramachandra-Reddy, A.** (1996). Fructose 2,6-biphosphate-modulated photosynthesis in sorghum leaves grown under low water regimes. *Phytochemistry-Oxford* **43**: 319-322.
- Rentsch, D., Hirner, B., Schemelzer, E., and Frommer, W.B.**(1996). Salt stress-induced proline transporters and salt stress-repressed broad specificity amino acid permeases identified by suppression of a yeast amino acid permease -targeting mutant. *Plant Cell* **8**: 1437-1446.
- Richard, B.S., Jensen, G., and Bohnert, H.J.** (1997). Increase resistance to oxidative estress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts. *Plant physiol.* **113**: 1177-1183.
- Rivoal, J., and A.D., H.** (1994). Choline-O-sulphate byosynthesis in plants. Identification and partial characterization of a salinity inducible choline sulfotransferase from species of Limonium (*Plumbaginaceae*). *Plant Physiol.* **106**: 1187-1193.
- Roberts, J.K., DeSimone, N.A., Lingle, W.L., and Dure III, L.** (1993). Cellular concentrations and uniformity of cell-type accumulation of two lea proteins in cotton embryos. *Plant Cell.* **5**: 769-780.
- Russel, B.L., Rathinasabapathi, B., and Hanson, A.D.** (1997). Osmotic stress induces expression of choline monooxygenase in sugar beet. *The American Society of plant Physiologists*.
- Sadava, D., and Chrispeels, M.J.**(1973). Hydroxyproline-rich wall protein (extensin):role in the cessation of elongation in excised pea epicolyls. *Dev. Biol.* **30**: 49-55.
- Schobert, B.** (1977). Is there an osmotic regulatory mechanism in algae and higher plants? *J. Theor. Biol.* **68**: 17-26.
- Shen, Q., Chen, C.N., Brands, A., Pan, S.M., and Ho, T.D.**(1997). Developmental regulation and potential function of a barley stress-induced gene whose homologs are present in diverse organisms including human and yeast. *The American Society of plant Physiologists*. Abstract number 234.
- Silhavy, D., Hutvagner, G., Barta, E., and Banfalvi, Z.** (1995). Isolation and characterization of a water-stress-inducible cDNA clone from *Solanum chacoense*. *Plant Mol. Biol.* **27**: 587-595.
- Smirnoff, N., and Cumbes, Q.J.**(1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* **28**: 1057-1060.
- Spollen, W.G., and Nelson, C.J.**(1994). Response of fructan to water deficit in growing leaves of tall fescue. *Plant Physiol* **106**: 329-336.
- Stroeher, V.L., Boothe, J.G., and Good, A.G.**(1995). Molecular cloning and expression of a

turgor -responsive gene in *Brassica napus*. *Plant Mol. Biol.* 27: 541-557.

Stuart, D.A., and Varner, J.E. (1980). Purification and characterization of a salt-extractable hydroxyproline rich glycoprotein from aerated carrot discs. *Plant Physiol.* 66: 787-792.

Suzuki, H. (1993). Differential expression of two soybean (*glycine max* L.) Proline-Rich Protein genes after wounding. *Plant Phys.* 101: 1283-1287.

Talaz, L., and Zelger, E. (1991). *Plant Physiology*. In The Benjamin/Cummings series in the life sciences, Editor, Eds. The Benjamin/Cummings Company, Inc.). pp. Pages.

Tanimoto, E., and Igarai, M. (1976). Correlation between  $\beta$ -galactosidase and auxin-induced elongation in etiolated pea stems. *Plant Cell Physiol.* 17: 673-682.

Tarczynski, M.C., Jensen, R.G., and Bohnert, H.(1993). Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. *Science* 259: 508-510.

Thomas, J.C., Sepahi, M., and Bohnert, H.J.(1995). Enhancement of seed germination in high salinity by engineering mannitol-expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Env* 18: En prensa.

Tiburcio, A.F., Besford, R.T., Capell, T., Borrell, A., Testillano, P.S., and Risueno, M.C. (1994). Mechanisms of polyamine action during senescence responses induced by osmotic stress. *J. Exp. Bot.* 45: 1789-1800.

Torres-Schumann, S., Godoy, J.A., and Pintor-Toro, J.A.(1992). A probable lipid transfer protein gene is induced by NaCl in stems of tomato plants. *Plant Mol. Biol.* 18: 749-757.

Tsiantis, M.S., Bartholomew, D.M., and Smith, J.A. (1996). Salt regulation of transcript levels for the c subunit of a leaf vacuolar H(+)-ATPase in the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant J.* 9: 729-736.

Umeda, M., Hara, C., Matsubayashi, Y., Li, H.H., Liu, Q., Tadokoro, F., Aotsuka, S., and Uchimiya, H. (1994). Expressed sequence tags from cultured cells of rice (*Oriza sativa* L.) under stressed conditions: analysis of transcripts of genes engaged in ATP-generating pathways. *Plant Mol. Biol.* 25: 469-478.

Velasco, R., Salamini, F., and Bartels, D. (1994). Dehydration and ABA increase mRNA levels and enzyme activity of cytosolic GAPDH in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Mol. Biol.* 26: 541-46.

Vernon, D.M., and Bohnert, H.J. (1992). A novel methyl transferase induced by osmotic stress in the facultative halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *EMBO J.* 11: 2077-2085.

Vernon, D.M., Ostrem, J.A., and Bohnert, H.J.(1993). Stress perception and response in a facultative halophyte: the regulation of saline-induced genes in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Cell Environ.* 16: 437-44.

Vierling, E. (1991). The roles of heat shock proteins in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 570-620.

Vijaranakul, U., Nadakavukaren, M.J., Bayles, D.O., Wilkinson, B.J., and Jayaswal,

**R.K. (1997).** Characterization of an Na-Cl sensitive *Staphylococcus aureus* mutant and rescue of the Na-Cl sensitive phenotype by glycine betaine but not by other compatible solutes. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1889-1897.

**Walters, C., Walker-Simmons, M.K., and Ried, J.L. (1997).** Heat-soluble proteins extracted from wheat seed embryos have tightly bound sugars and unusual hydration properties. The American Society of plant Physiologists. Abstract number 503.

**Werellnyk, E., Orr, W., White, T.C., Lu, B., and Singh, J. (1993).** Characterization of three related low-temperature regulated cDNAs from winter *Brassica napus*. *Plant Phys.* **101**: 171-177.

**White, D.A., and Zilinskas, B.A. (1991).** Nucleotide sequence of a complementary DNA encoding pea cytosolic copper/zinc superoxide dismutase. *Plant Physiol.* **96**: 1391-92.

**Williamson, J.D., Stoop, J.M., Massel, M.O., Conkling, M.A., and Pharr, D.M. (1995).** Sequence analysis of a mannitol dehydrogenase cDNA from plants reveals a function for the pathogenesis-related protein ELI3. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 7148-7152.

**Wu, Y., Sharp, R.E., Durachko, D.M., and Cosgrove, D.J. (1996).** Growth maintenance of the maize primary root at low water potentials involves increases in cell-wall extension properties, expansin activities, and wall susceptibility to expansins. *Plant Physiol.* **111**: 765-772.

**Xu, D.P.e.a. (1996).** Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol.* **110**: 249-257.

**Yamamoto, K.T., Mori, H., and Imaseki, H. (1992).** Novel mRNA sequences induced by indole-3-acetic acid in sections of elongating hypocotyls of mung bean (*Vigna radiata*). *Plant Cell Physiol* **33**: 13-20.

**Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowler, P.D., and Somero, G.N. (1982).** Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217**: 1214-1217.

**Yoshida, Y., Kiyosue, T., Katagiri, T., Ueda, H., Mizoguchi, T., and et al. (1995).** Correlation between the induction of a gene for  $\delta$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. *Plant J.* **7**: 751-760.

**Zhu, D., and Scandalios, J.G. (1994).** Differential accumulation of manganese-superoxide dismutase in maize in response to abscisic acid and high osmoticum. *Plant Physiol.* **106**: 173-178.

## CAPÍTULO 2

# CARACTERIZACIÓN DE CLONES DE cDNA DE *Phaseolus vulgaris* QUE RESPONDEN A DÉFICIT HÍDRICO Y A ABA

### I. HIPÓTESIS

Los genes inducidos en las plantas como respuesta a la deshidratación van a participar en el proceso de aclimatación de la planta a las condiciones déficit hídrico.

### II. OBJETIVO GENERAL

A través del estudio de los genes que responden a déficit hídrico y de sus productos, intentaremos caracterizar los mecanismos empleados por las plantas para adquirir tolerancia al estrés osmótico y aplicar esos conocimientos en la obtención de plantas con mayor grado de resistencia al déficit hídrico.

### III. MATERIAL DE PARTIDA

El estudio de genes implicados en la respuesta de *Phaseolus vulgaris* al déficit hídrico comenzó con la construcción de una genoteca substráida de ADNc en el profago  $\lambda$ -gt-22 de frijol sometido primero a sequía y posteriormente a ABA exógeno. Dicho banco está enriquecido en clones de expresión específica por sequía y/o ABA [Covarrubias y Garcíarrubio, 1993]. Mediante hibridación diferencial de la genoteca contra sondas radiactivas de la primera cadena de ADNc (ADNc-1c) obtenida de plantas sometidas a sequía o a ABA respecto a sondas de ADNc-1c obtenida de plantas control, se aislaron 39 clones de ADNc correspondientes a genes con probable expresión diferencial por sequía, ABA o ambos. Los clones se clasificaron según se indujesen o reprimiesen por déficit hídrico y/o ABA. En base a ésto se organizaron 5 grupos diferentes con las diferentes combinaciones posibles de inducibilidad/represión [Covarrubias y Garcíarrubio, 1993]. La colección de clones de ADNc de probable expresión diferencial fue el material de partida del proyecto de esta tesis (Fig.

1). Principalmente escogimos clones del grupo I (se inducen por déficit hídrico y tratamiento con ABA). Ya que la mayor parte de los genes que responden a sequía también responden a la aplicación de ABA, había más garantía de que los componentes del grupo I no fuesen falsos positivos. Escogimos los siguientes:

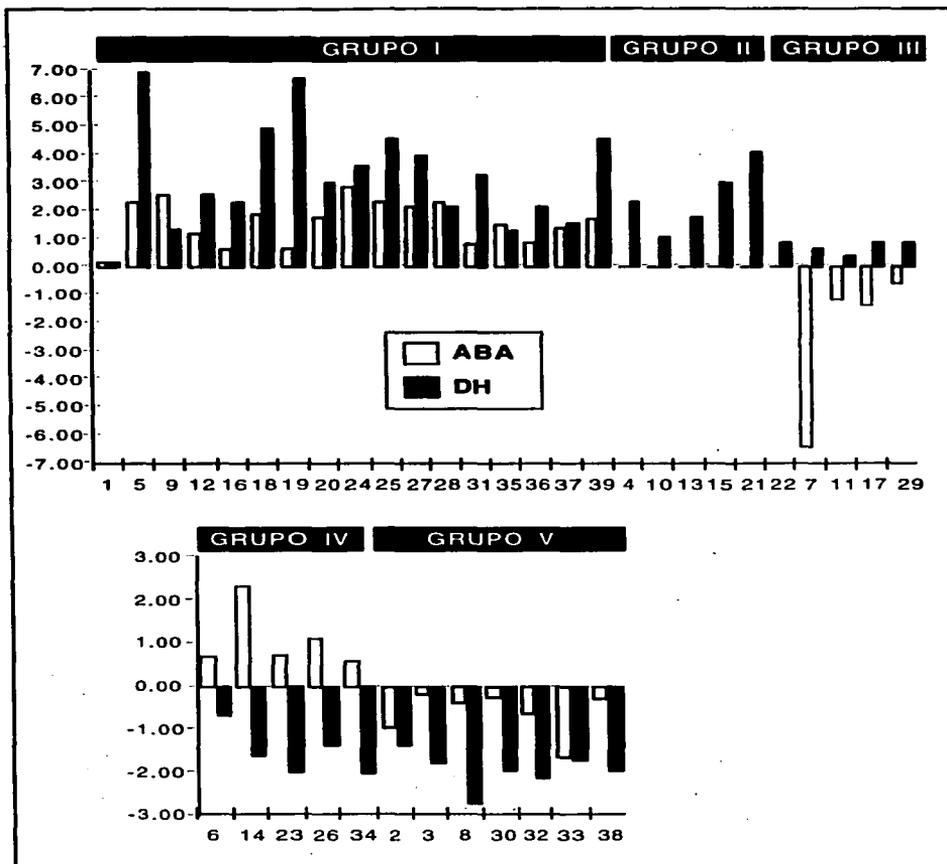
**Grupo 1 (ABA +, sequía +): clones 12, 18, 19, 20, 24, 25, 27, 31, 37, 39**

**Grupo 2 (sequía +) : clones 4, 15**

**Grupo 3 (ABA -, sequía +): clon 7**

**Grupo 4 (ABA +, sequía -): ninguno**

**Grupo 5 (ABA -, sequía -): clones 8 y 32**



**Fig.1:** Clasificación de los clones de ADNc según el valor cuantificado de su expresión obtenido de los análisis de expresión diferencial. Los valores positivos indican inducción respecto al valor control de expresión, y los valores negativos indican represión [Covarrubias y Garcíarrubio, 1993]. ABA: inducibilidad por aplicación de ABA. DH: inducibilidad por déficit hídrico

**CARACTERIZACIÓN DE CLONES DE ADNc DE *Phaseolus vulgaris* QUE RESPONDEN A DÉFICIT HÍDRICO: IDENTIFICACIÓN DE UN NUEVO GEN SIMILAR A LOS DE LAS PROTEÍNAS DE EMBRIOGÉNESIS TARDÍA**

**1. Objetivos específicos**

Caracterizar genes de *Phaseolus vulgaris* inducidos en respuesta a déficit hídrico o a tratamiento con la fitohormona ácido abscísico. Para ello se seguirán los siguientes pasos:

1. Selección de clones de ADN-complementario (ADNc) procedentes de transcritos diferencialmente acumulados en plantas tratadas (déficit hídrico y/o ABA) respecto a plantas no tratadas (bien hidratadas).
2. Caracterización de la expresión de los genes correspondientes a los diferentes clones mediante experimentos tipo northern.
3. Secuenciación de los clones de ADNc.

**2. Publicación**

A continuación presento los datos obtenidos de la caracterización de algunos de los clones del grupo 1, y que han sido publicados en la revista *Plant Molecular Biology*.

## Characterization of *Phaseolus vulgaris* cDNA clones responsive to water deficit: identification of a novel late embryogenesis abundant-like protein

José M. Colmenero-Flores, Francisco Campos, Alejandro Garciarrubio and Alejandra A. Covarrubias\*

Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62250, México (\*author for correspondence)

Received 31 October 1996; accepted in revised form 20 May 1997

**Key words:** *Phaseolus vulgaris*, water-deficit genes, late embryogenesis-abundant proteins, proline-rich proteins, lipid transfer proteins, low-molecular-weight heat shock proteins

### Abstract

Six cDNA clones from *Phaseolus vulgaris*, whose expression is induced by water deficit and ABA treatment (rsP cDNAs) were identified and characterized. The sequence analyses of the isolated clones suggest that they encode two types of late-embryogenesis abundant (LEA) proteins, a class-1 cytoplasmic low-molecular-weight heat-shock protein (lmw-HSP), a lipid transfer protein (LTP), and two different proline-rich proteins (PRP). One of the putative LEA proteins identified corresponds to a novel 9.3 kDa LEA-like protein. During the plant response to a mild water deficit ( $\Psi_w = -0.35$  MPa) all genes identified present a maximal expression at around 16 or 24 h of treatment, followed by a decline in expression levels. Rehydration experiments revealed that those genes encoding PRPs and LTP transiently re-induce or maintain their expression when water is added to the soil after a dehydration period. This is not the case for the *lea* genes whose transcripts rapidly decrease, reaching basal levels a few hours after rehydration (4 h). Under water deficit and ABA treatments, the highest levels of expression for most of the genes occur in the root, excluding the *lip* gene whose maximum expression levels are found in the aerial regions of the plant. This indicates that for these genes, both water deficit and ABA-dependent expression are under organ-specific control. The data presented here support the importance of these proteins during the plant response to water deficit.

### Introduction

Water deficit is one of the most common environmental stress factors experienced by soil plants. It interferes with both normal development and growth and has a major adverse effect on plant productivity. Among a diversity of responses, plants adapt to water deficit by the induction of specific genes (reviewed in [29]). Some of these genes are also expressed during the normal embryogenesis program when seeds desiccate and embryos become dormant [51]. During this developmental stage, plant tissues are viable for long periods

of time in conditions of extremely high dehydration. Both environmental and developmental processes have in common the mediation of the phytohormone abscisic acid (ABA) [8, 51, reviewed in 9]. The application of ABA to unstressed vegetative tissues can mimic many effects of drought on plants, including the induction of water deficit-responsive genes [51, reviewed in 9]. In recent years, efforts have been focused toward the isolation of genes that are induced during water deficit or ABA treatment in order to study the function of their products. This approach has made possible the identification of stress proteins and the characterization of their biochemical, cellular and adaptive roles in osmotic stressed plant cells. This is the case of proteins implicated in the biosynthesis of osmolytes (reviewed in [4, 29], in the uptake and compartmentation of ions [42, 43], in hydroxyl-radical scavenging [4, 48], and

The nucleotide sequence data reported will appear in the EMBL, GenBank and DDBJ Nucleotide Sequence Databases under the accession numbers U72764 (PvPRP-12), U72765 (PvLTP-24), U72766 (PvHSP17-19), U72767 (PvLEA-4-25), U72768 (PvPRP2-37) and U72769 (PvPrp-12).



in protein turnover [5, 34, 35]. Although other proteins have been identified whose levels are affected by water deficit, the lack of knowledge of their biochemical activities or *in vivo* functions in the cell does not enable assignment of a role in water stressed plants. Such is the case of some metabolic enzymes [24, 39, 53]; osmotin [36]; lipid transfer proteins (LTPs) [52, reviewed in 32]; low-molecular-weight heat shock proteins (lmw-HSPs) [2]; water channels or aquaporins (reviewed in [11]); and some cell wall structural proteins [15, 17, 23]. In the case of the late embryogenesis-abundant (LEA) proteins there is a strong circumstantial evidence for their involvement in the plant adaptation to water deficit. The fact that *lea* transcripts and proteins accumulate in vegetative tissues of a number of drought-stressed plants and that desiccation treatments can often induce their precocious expression in seeds has led to the proposition that LEA proteins may play a protective role in maintaining specific cellular structures or ameliorate the effects of drought stress. This hypothesis is consistent with the properties predicted from their deduced amino acid sequence, such as their high hydrophilicity and randomly coiled moieties [21].

Some of the genes mentioned above have been shown to respond not only to other environmental factors including heat shock, infection, wounding, light, etc., but also have been shown to be involved in the normal developmental processes of unstressed plants [2, 11, 24, 32, 47]. This is not surprising given the multiple physiological and metabolic alterations induced in the plant by water deficit, as well as the fact that many of them belong to gene families. At this time the role of some of these proteins during plant adaptation to water stress cannot be defined given the few data available regarding the functional characterization of these proteins in response to this kind of stress.

In order to study the molecular basis of the plant responses to water deficit, we have isolated and characterized cDNA clones corresponding to genes whose expression is affected by water deficit and/or ABA treatment in *Phaseolus vulgaris*, a staple food in Latin America diets. In this paper we describe the characterization of six cDNA clones, including their nucleotide sequence analysis, as well as expression patterns showing the importance of the corresponding proteins during the plant response to water deficit. One of the characterized cDNAs encodes a putative novel LEA protein. The function of the gene products from the *Phaseolus* cDNA clones during water deficit is discussed.

## Materials and methods

### *Plant material and growth conditions*

Bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Negro Jamapa; Pronalse, México) were surface-sterilized in 10% (v/v) sodium hypochlorite for 10 min, rinsed in running tap water for 2 h, sown on water-saturated paper towels and germinated in the dark at  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  and 100% relative humidity. After 4 days, seedlings were selected for uniform size and transplanted to vermiculite containing different amounts of water. The control growth condition contained 5 ml of water per gram of vermiculite ( $\Psi_w = -0.074$  MPa). The water deficit conditions corresponded to  $\Psi_w = -0.35$  MPa, 1/12 $\times$  the amount of water relative to the control. Vermiculite was maintained at a constant water potential throughout the experiment. Seedlings were grown in the dark at  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  and 75% relative humidity. The duration of the water deficit in the different treatments is indicated in the text and in the corresponding figure legends. For the rehydration experiments, seedlings subjected to water deficit ( $\Psi_w = -0.35$  MPa) during 48 h were rehydrated by the addition of water to the low-water-potential vermiculite until field capacity. Seedlings were harvested 4, 8, 24 and 48 h after rewatering. For cold treatment, dark-grown 4-day old bean seedlings were transferred to  $4^\circ\text{C}$  and maintained at this temperature for 24 h. Three-day old etiolated seedlings were exposed to heat shock at  $42^\circ\text{C}$  for 2 h in a chamber where relative humidity was maintained constant at 100% to avoid dehydration. In all cases plant material was frozen immediately in liquid  $\text{N}_2$  after harvesting, and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until used for extraction.

When water deficit was imposed to 21-day old bean plants, seedlings were grown in the greenhouse on saturated filter paper with nutrient solution (half-strength Hoagland medium) until the development of the primary leaves (21-day old) was completed. To avoid tissue damage induced by transplantation, water deficit was imposed by adding vermiculite of the desired water potential. Irrigated plants were harvested at the same developmental stage as water-deficient plants. ABA treatment was carried out by adding of 0.1 mM ABA to the irrigating solution and by spraying an ABA solution (0.1 mM) on the aerial regions. Plants were harvested after 24 h of treatment. Tissues were frozen immediately in liquid  $\text{N}_2$  and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until used for extraction.

### Growth determinations

Growth was determined by measuring hypocotyl length between the point of insertion of the cotyledon and the hypocotyl-root transition at the times indicated.

### Water potential measurements

Water potential ( $\Psi_w$ ) was determined following the dew point and psychrometric methods as described in the instruction manual for the HR-33T Dew Point Microvoltmeter (Wescor) using a soil psychrometer (model PST-55-15).

### RNA isolation and northern Analysis

Total RNA was prepared by the 'hot phenol' method, following the procedure described by de Vries *et al.* [18]. The RNA was dissolved in RNase-free water and its concentration was determined spectrophotometrically at 260 nm. Poly(A<sup>+</sup>) RNA was obtained using the PolyAtract mRNA isolation system (Promega). Northern blots were carried out by electrophoresis of 5  $\mu$ g of total RNA on 1.5% (w/v) agarose gels containing 2.2 M formaldehyde according to Maniatis *et al.* [40] and transferred onto nylon membranes (Hybond-N<sup>+</sup>, Amersham). Hybridization and subsequent washes were performed at high stringency following the procedure described by Church and Gilbert [12]. Filters were exposed to Kodak XAR film at -80 °C using an intensifying screen. The mRNA levels were quantified using the 1-D Analysis Program from Bio-Image Products (Millipore). The resulting values were normalized with those obtained from the 28S rRNA hybridization and are indicated as numbers below the lanes on the blots. Those numbers represent an arbitrary unit which was obtained by multiplying the intensity value obtained for each transcript for a loading correction factor according to the intensities of the 28S rRNA band; therefore, they do indicate the relative abundance of the corresponding mRNAs.

### Labeling of probes

Fragments containing the cDNA 3' non-coding regions were used as probes for northern blots. The chalcone synthase probe was obtained from plasmid pCHS1 kindly provided by C. Lamb [45]. Probes were labeled with [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (3000 Ci/mmol; Amersham).

### Library construction and isolation of water deficit-induced cDNA clones

A complementary DNA library was constructed from poly(A)<sup>+</sup> RNA isolated from 21-day old bean plants exposed to water deficit treatment as described elsewhere [14]. To increase the representation of cDNA clones containing genes whose expression is induced by drought, the  $\lambda$ gt23 cDNA library was subtracted with poly(A)<sup>+</sup> RNA isolated from well-watered plants using the Subtractor TM kit (Invitrogen). Phages harboring water deficit-induced cDNAs were selected by differential screening with labeled cDNA from control and water-deficient bean seedlings. About 10 000 phage were screened. After 3 screens, 6 clones, out of a total of 27, which showed differential expression with regard to water deficit, were selected for further characterization. Inserts from phage were subcloned into the pKS<sup>+</sup> vector (Stratagene). The cDNA clones that showed a higher expression in response to water deficit conditions were named with the initials rsP for the words in Spanish: respuesta a sequía en Phaseolus.

### DNA sequencing and sequence analysis

DNA manipulations were performed essentially as described by Sambrook *et al.* [46]. cDNAs were subcloned into the pKS<sup>+</sup> vector (Stratagene) and sequenced using the Sequenase kit (United States Biochemicals) following the instructions of the manufacturer. DNA sequences of the cDNA inserts and the corresponding amino acid deduced sequences were deposited in the gene bank-EMBL under the accession numbers indicated in Table 1. Nucleotide and amino acid sequence comparisons were carried out using the GCG package program [19].

### Results

#### Isolation of cDNAs corresponding to genes induced by water deficit and ABA: nucleotide sequence analysis

Out of the 27 cDNA clones initially identified from the differential screening of the subtracted library (see Materials and methods), six clones whose corresponding genes were induced by water deficit and ABA treatment were selected for further characterization. The inserts of the selected clones, rsP12, rsP18, rsP19, rsP24, rsP25 and rsP37, were subcloned into pKS plasmid vectors, their nucleotide sequences were

Table 1. Characteristics of cDNA clones and predicted proteins.

cDNA clone	cDNA length (bp)	Estimated mRNA length (nt) <sup>1</sup>	Homology	Reference	aa Identity, % <sup>2</sup>	Putative product <sup>3</sup>	Name of the protein <sup>4</sup>	Accession number
rsP12	350	1180	SbPRP-1 and -2	27,28	70 <sup>a</sup>	proline rich protein	PvPRP-12	U72769
rsP18	525	550	-	-	-	Lea protein	PvLEA-18	U72764
rsP19	445	800	PsHsp17.7	36	81 <sup>b</sup>	lmw-HSP	PvHSP17-19	U72766
rsP24	644	785	MZEPLTP	49	56 <sup>c</sup>	lipid transfer	PvLTP-24	U72765
rsP25	443	850	pGmPM11	10	86 <sup>d</sup>	group 4-LEA	PvLEA4-25	U72767
rsP37	1100	1180	SbPRP2	27	98 <sup>e</sup>	proline rich	PvPRP2-37	U72768

<sup>1</sup> Estimated from electrophoretic mobility in northern hybridizations. <sup>2</sup> Compared to the proteins that present the highest amino acid (aa) sequence homology in fasta and blast analyses: <sup>a</sup> against aa 225-257 of SbPRP1 and against aa 195-230 of SbPRP2; <sup>b</sup> against aa 81-155 of PsHsp17.9; <sup>c</sup> against the whole polypeptide MZEPLTP; <sup>d</sup> against aa 80-152 of pGmPM11; <sup>e</sup> against aa 66-146 of SbPRP2. <sup>3</sup> Putative identity of the rSP gene products. <sup>4</sup> "Pv" indicates *Phaseolus vulgaris*; PRP, LEA, HSP and LTP define the protein families to which the gene products belong; the number after the dash corresponds to the cDNA clone number.

obtained and the corresponding putative proteins were deduced. Some characteristics of the cDNA clones and their predicted proteins are shown in Table 1.

The analysis of the rsP24 sequence showed a complete ORF encoding a putative 116 amino acids polypeptide. The deduced protein presents similarity with LTPs from different plants [41, 50], showing the highest identity (57%) with a maize LTP, MZEPLTP [50]. The properties of the deduced protein are common to plant LTPs: a low molecular weight, a basic isoelectric point, similar hydropathic profile, conservation of relative position among conserved cysteine residues and the presence of a putative signal peptide, MATLNSACVVAVLCLVLTAPTAAH, in the amino-terminal region [reviewed in 32].

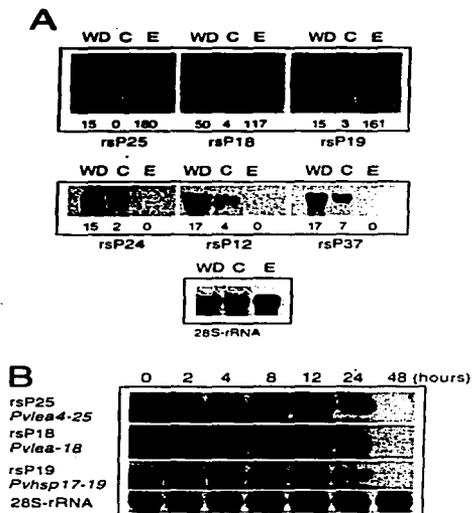
In the case of the rsP37 cDNA clone, sequence analysis shows an incomplete ORF lacking the initiation ATG codon and encodes for an 89 amino acids polypeptide that is 98% identical to the soybean PRP2 gene [28]. This sequence consists of almost perfect repetitions of the decamer PPVEKPPVYK that characterizes PRP2 proteins [28]. The 3' non-coding region in rsP37 shows 72% identity with the 3' non-coding region of the soybean *prp1* gene. These structural similarities strongly suggest that rsP37 encodes for a bean PRP2 protein. A putative PRP is also encoded by the rsP12 cDNA clone which contains a partial ORF corresponding to a 29 amino acid polypeptide that shows

70% identity with both soybean PRP1 [27] and PRP2 carboxy-terminal regions [28]. However, the partial polypeptide encoded by this clone presents only one copy of the PPVEKPPVYK decamer. This would make it compatible with both type 1 and type 2 PRPs, but given that the rsP12 clone is not full-length we cannot hypothesize the type of PRP encoded. The 3' non-coding region contained in rsP12 also presents a high conservation with the 3' non-coding regions from soybean *prp* genes (70% identity with *Sbprp3*, *Sbprp2* and *Sbprp1*) [27, 28]. This high sequence conservation in non-coding DNA regions among *prp* genes from different plant genera may indicate the presence of a functional domain within this region. It has been shown that a protein binding domain in the 3' untranslated region of a *prp*-mRNA from bean, different from the ones reported here, modulates transcript stability [55].

The rsP19 nucleotide sequence predicts an incomplete ORF that encodes a 77 amino acid polypeptide showing significant homology to class-I lmw-HSPs. The highest identity (81%) detected was to the *Pisum sativum* HSP17.9 protein [37]. As with other lmw-HSPs, the carboxy-terminal region of the predicted polypeptide contains the GVLTV motif present within a hydrophobic domain [44], strongly suggesting that rsP19 encodes a lmw-HSP.

Clone rsP25 encodes a 91 amino acids polypeptide which shows a high similarity to group 4-LEA proteins





*used*

**Figure 2.** Expression patterns of the rsP genes during water deficit treatment, late embryogenesis and germination. To compare the relative abundance of the rsP transcripts similar sized probes were used and the same cpm quantities were employed in every hybridization assay. Panel A shows the accumulation patterns of the rsP transcripts during water-deficit treatment and in dry bean embryos. Total RNAs were obtained from seedlings grown in the dark for 4 day and transplanted to water-stressed vermiculite ( $\Psi_{ww} = -0.35$  MPa) (WD) or to well watered vermiculite ( $\Psi_{ww} = -0.074$  MPa) (C) during 24 h. Total RNA was also obtained from embryonic axis excised from bean dry seeds (E). Total RNAs ( $5 \mu\text{g}$ ) were electrophoresed, blotted to nylon membranes and hybridized against the indicated probes containing the same cpm amount. Hybridization against a 28S-rRNA probe was used as a RNA loading control. The hybridization signals were quantified using the 1-D Analysis Program from Bio-Image Products (Millipore). The resulting values, normalized with those obtained for the 28S-rRNA hybridization, are shown below each lane. Panel B shows the expression patterns of rsP18, rsP19 and rsP25 transcripts during germination. In this case total RNAs ( $5 \mu\text{g}$ ) obtained from dry seeds (time 0) and from germinating seeds 2, 4, 8, 12, 24 and 48 h after imbibition were loaded on the gel. The results shown in this figure were reproducible in 3 independent experiments.

be expected that rsP18, rsP25 and rsP19 mRNAs show a similar behavior. To test this, northern blot analysis was carried out using total RNAs obtained from dry and germinating seeds after 2, 4, 8, 12, 24 and 48 h of imbibition. As shown in Figure 2B, all rsP mRNAs remained unchanged during the first 12 h of imbibition, subsequently the abundance of the three transcripts began to decrease and by 48 h after imbibition none of the transcripts could be detected as expected for *lea* and *lmw-hsp* genes (Figure 2B).

#### *Effect of ABA and water deficit treatments on the expression of rsP genes in different plant organs*

To determine if the rsP genes show organ-specific expression we hybridized the clones against total RNAs isolated from roots, stems, and fully expanded leaves of 21-day old control and water-stressed bean. The results obtained indicated that transcript levels of five of the rsP cDNAs show a higher accumulation under water deficit in roots than in other plant organs (stems or leaves). In contrast, the *ltp* mRNA accumulation is higher in stems and leaves than in roots (Figure 3). Also, it was observed that the *Pvlea* transcripts (rsP25 and rsP18 cDNA clones) were the only transcripts not present in detectable levels under irrigated conditions, whereas the other rsP transcripts (*Pvhsp17-19*, *Pvprps* and *Pvltip*) seem to respond to other stimuli, possibly modulated during plant development, in specific regions of control plants. For example, it can be seen that the *Pvhsp17-19* and the *Pvprp* transcripts are present in roots but not in stems or leaves of well-watered plants. A similar situation occurs with the *Pvltip-24* transcript which can be detected in the aerial regions, but not in roots, of plants grown under irrigated conditions (Figure 3).

The expression pattern of the rsP transcripts after ABA treatment of 21-day old bean plants (see Materials and Methods for details) was also analyzed. ABA (0.1 mM) was applied to the soil in the watering solution and by spraying the aerial regions. Interestingly, the ABA treatment induces the accumulation of the rsP transcripts with the same pattern as the water deficit treatment: those genes highly induced by water deficit in roots are also induced at similar levels by ABA; likewise, the *Pvltip-24* gene shows the same level of induction by water deficit and ABA in stems and leaves (Figure 3). These results indicate that the ABA and/or water deficit dependent transcription of the rsP genes is modulated in an organ specific manner.

## EXPRESIÓN DE LOS GENES DE RESPUESTA A SEQUÍA EN LAS DIFERENTES REGIONES DE CRECIMIENTO DE HIPOCÓTILOS DE FRIJOL

### 1. Justificación

Si recordamos el apartado sobre los efectos del déficit hídrico en el crecimiento, en el Capítulo 1 introductorio, se explicó que para que se produzca el fenómeno de expansión celular se requiere del concurso de dos factores: una pared celular extensible y un grado mínimo de una fuerza motora constituida por la presión de turgor, ejercida contra la pared celular. El turgor se consigue a través de la entrada de agua en la célula vegetal, razón por la cual el crecimiento celular es tan sensible al déficit hídrico en tejidos aéreos, donde la evapotranspiración diurna hace que el turgor se encuentre frecuentemente cerca del umbral de rendimiento o valor por debajo del cual ya no se consigue la deformación plástica de la pared. Para asegurarse una activa entrada de agua que genere turgor y que compense la pérdida por evaporación e, incluso, por déficit hídrico, las plantas llevan a cabo un ajuste osmótico induciendo una acumulación de osmolitos en los tejidos en proliferación y crecimiento. Este ajuste osmótico supone el mantenimiento de potenciales hídricos más negativos en las células en crecimiento comparadas con las células maduras. Todo órgano tiene una pequeña región de división celular donde las células se encuentran en continua mitosis. Esta zona se continúa con la región de elongación y diferenciación celular, donde las células aumentan varias o muchas veces su volumen, adquiriendo una forma y función determinada. Finalmente, existe una región donde las células han dejado de crecer, que se conoce como región madura. Aquí, las células ya plenamente diferenciadas poseen paredes celulares más desarrolladas y rígidas (Fig. 2). Por lo general, cuando se caracteriza en plantas la inducción de un gen que responde a factores medioambientales, se suele investigar la expresión diferencial del gen en los diversos órganos de la planta. Pero casi nunca se analiza la expresión específica de un gen en las diferentes regiones de crecimiento de un órgano. Este tipo de análisis se ha limitado únicamente a ciertos grupos de genes, como aquéllos que codifican para algún tipo de proteína de la pared celular por su relación con los mecanismos que determinan su grado de extensibilidad. Este es el caso de diversas proteínas estructurales de la pared [revisado en Keller, 1993 y Showalter, 1993].

Dada la regulación diferencial del estatus hídrico en las distintas regiones de crecimiento de un órgano, consideramos un análisis novedoso el estudio de la expresión de nuestros genes de respuesta a estrés osmótico en cada región de crecimiento del hipocotilo de plántulas de *Phaseolus vulgaris*. Esto nos podría aproximar a la función de cada gen en tanto que pueda participar en el proceso de generación de turgor, en modificar la pared celular, etc., y pueda darnos información acerca de la naturaleza de los factores involucrados en la inducción del gen, como la pérdida de turgor la disminución del potencial hídrico o factores asociados al estado de desarrollo.

## 2. Hipótesis

El estatus hídrico de las regiones de crecimiento del hipocotilo modula la expresión de genes de respuesta a estrés osmótico

## 3. Objetivos

1. Determinar la acumulación del transcrito correspondiente a cada clon de ADNc en las diferentes regiones de crecimiento de hipocotilos de plántulas etioladas de *Phaseolus vulgaris* bien irrigadas o sometidas a déficit hídrico.

2. Correlacionar dicha expresión diferencial con los datos fisiológicos que obtenemos de las plántulas de *Phaseolus vulgaris* sometidas a los mismos tratamientos:

- valores de potencial hídrico, potencial osmótico y presión de turgor obtenidos en cada región de crecimiento del hipocotilo
- tasa de crecimiento.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Determinación de las regiones de crecimiento del hipocotilo y efecto del estrés en el crecimiento de plántulas de *P. vulgaris*

En estudios sobre la capacidad de crecimiento de diferentes zonas del hipocotilo de soja, así como en otros donde se caracterizan proteínas de pared celular en dicho sistema [Nonami y Boyer, 1989; Creelman et al., 1991], se diferenció entre la región de división (región apical con baja tasa de elongación); región de elongación (región sub-apical con alta tasa de elongación); y región madura (región basal sin capacidad de elongación). El hipocotilo de frijol es casi idéntico al de soja, por lo que fue fácil identificar dichas regiones en nuestro sistema. Esta elección fue confirmada a la vista del grado de diferenciación de los tejidos obtenidos de cada región y observados al

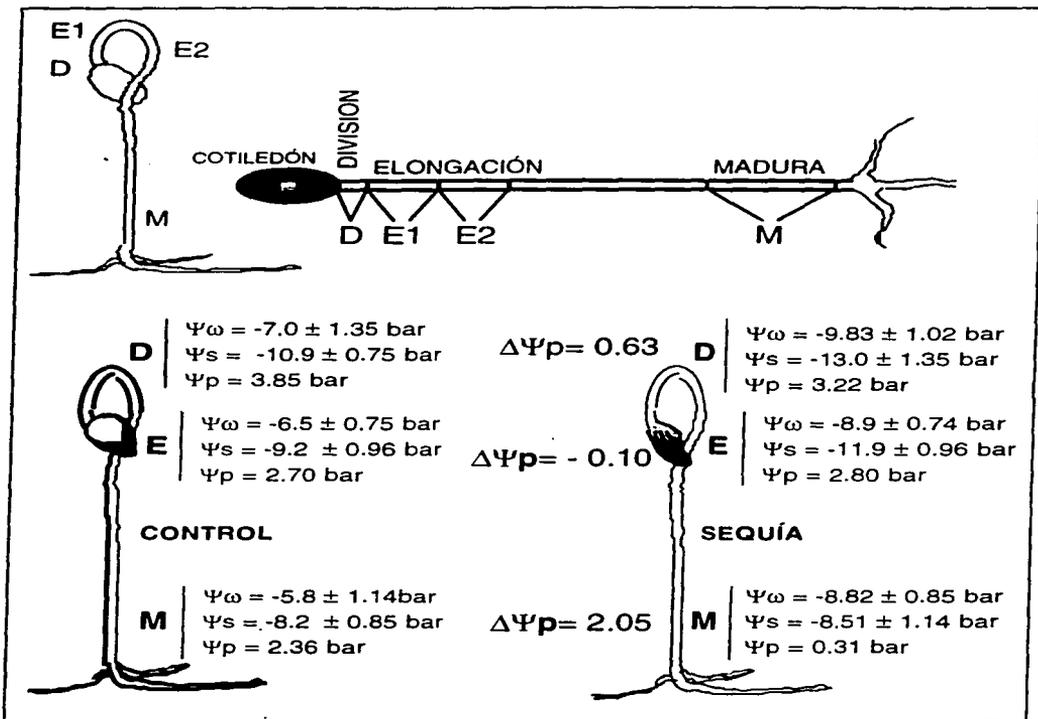
microscopio óptico (ver en el Cap. 3). En la Fig. 2 mostramos el aspecto de un hipocotilo donde se indican las regiones de crecimiento. En nuestro sistema se determinó además el efecto del déficit hídrico en el crecimiento del hipocotilo de plántulas de *P. vulgaris*. Estos y otros datos fisiológicos son parte de los resultados de la tesis de licenciatura de la Ingeniero Químico Claudia Smith Espinoza, que fue desarrollada en el laboratorio [Smith, 1997]. Comprobamos que el déficit hídrico disminuye la tasa de crecimiento del hipocotilo de plántulas etioladas. El mayor nivel de inhibición lo medimos a las 24h de tratamiento, donde las plántulas estresadas crecían a una velocidad 81.6% menor que las control. También verificamos que la rehidratación de las plántulas estresadas permitió una progresiva recuperación de su tasa de crecimiento [Smith, 1997].

#### 4.2. Determinación de los valores de potencial hídrico y osmótico de cada región de crecimiento.

Los valores de potencial hídrico ( $\Psi_w$ ) y osmótico ( $\Psi_s$ ) se calcularon experimentalmente mediante un psicrómetro según describimos en materiales y métodos. La presión de turgor ( $\Psi_p$ ) se determinó restando el valor absoluto de  $\Psi_s$  al valor absoluto de  $\Psi_w$ , o sea:

$$\Psi_p = |\Psi_s| - |\Psi_w|$$

Los resultados (Fig. 2) muestran que la sequía produce una importante pérdida de turgor en la región madura del hipocotilo, mientras que no ocurre esto en las regiones de crecimiento. La razón de esta diferencia de comportamiento la encontramos en los valores del  $\Psi_s$ . Mientras que la región madura posee un valor más positivo de  $\Psi_s$ , y apenas lo modifica en respuesta a déficit hídrico, las regiones de división y elongación poseen un valor de  $\Psi_s$  más negativo y, en respuesta a déficit hídrico, lo disminuyen aún más. En términos biológicos esto significa que en condiciones de irrigación óptima, las regiones de crecimiento acumulan más osmolitos que la región madura. Además, a diferencia de la región madura, las regiones de crecimiento se ajustan osmóticamente durante el déficit hídrico a través de la acumulación de cantidades aún mayores de osmolitos.

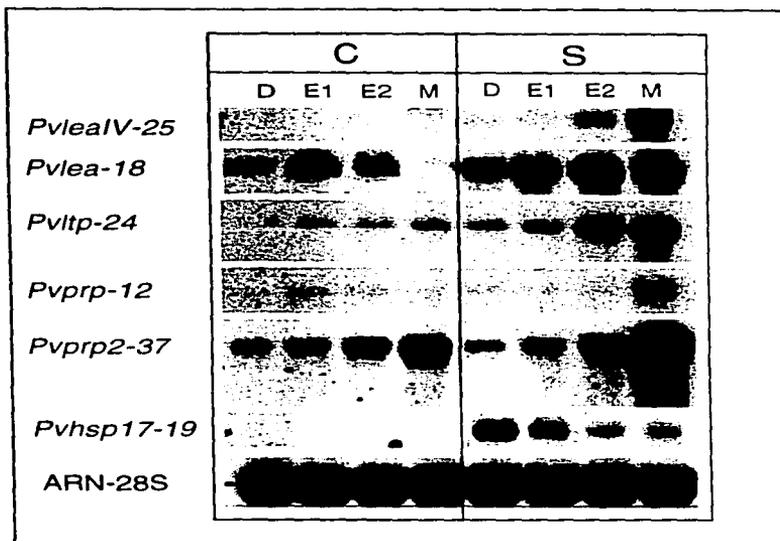


**Fig. 2:** Descripción de las regiones de crecimiento del hipocotilo de *P. vulgaris* y sus valores de potencial hídrico ( $\Psi_w$ ) y osmótico ( $\Psi_s$ ), así como de la presión de turgor ( $\Psi_p$ ).  $\Delta\Psi_p$  representa la pérdida de turgor por sequía [Smith, 1997].

#### 4.3. Regulación de los genes de respuesta a sequía en las regiones de crecimiento

Mediante experimentos tipo northern, analizamos el comportamiento de los transcritos de los genes de respuesta a estrés en las regiones de

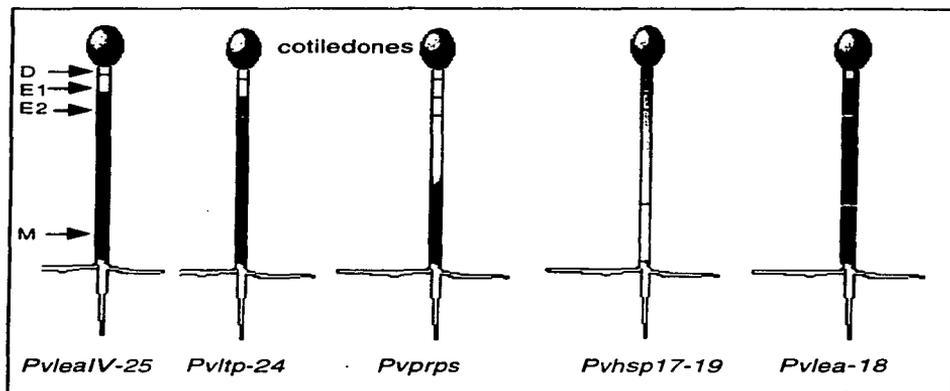
crecimiento, descritas en la Fig. 2, obtenidas de plántulas transplantadas 24h a vermiculita control o vermiculita poco hidratada (Fig. 3). En la Fig. 4 se muestra un esquema de los datos obtenidos en los experimentos tipo northern.



**Fig. 3:** Expresión de los genes de respuesta a sequía en las diferentes regiones de crecimiento de hypocotilos control (C) o sometidos a déficit hídrico (S).

Podemos observar, como ya se ha descrito en el artículo, que los genes correspondientes a la LTP y a las PRPs acumulan ciertos niveles de transcrito en condiciones control. En el caso del gen de la LMW-HSP, no se observa transcrito en el hypocotilo de plántulas control porque en esas condiciones sólo se acumula en la raíz (ver artículo). La acumulación del ARNm del gen *Pvlea-18* en la región de elongación del hypocotilo de plántulas bien irrigadas es un resultado inesperado que exploraremos en el siguiente capítulo. El gen *PvleaIV-25* no posee niveles detectables de transcrito en el hypocotilo de plántulas

control. En respuesta a déficit hídrico, los genes correspondientes a LEAs, LTP y PRPs acumulan su transcrito en las regiones del hipocotilo que verifican una mayor pérdida de turgor. Esto indica que para estos genes la pérdida de turgor puede ser el factor determinante de su expresión. Este no sería el caso del gen *Pvhsp17-19*, que, durante el déficit hídrico, acumula principalmente su transcrito en la región de división. Consideramos de gran interés la expresión diferencial de este gen.



**Fig. 4:** Esquemización de las regiones donde se acumulan los transcritos de los clones en condiciones de déficit hídrico.

Dado que todos los genes responden a la aplicación de ABA, deben existir señales adicionales que determinan la acumulación mayoritaria del transcrito de *Pvhsp17-19* en la región de división. De nuevo aquí, nos encontramos con un ejemplo más de la dominancia de factores específicos de desarrollo sobre la expresión dependiente de sequía. Recordemos que en el artículo destacamos la dominancia del control órgano-específico sobre la expresión por sequía y ABA de los genes que estamos caracterizando.

Sobre la relación entre la expresión de estos genes en las regiones de crecimiento y la posible función biológica de las proteínas para las que codifican, sólo podemos especular:

- PvLEAIV-25: posible osmoprotector en células de la región madura que, siendo incapaces de recuperar el turgor, están sufriendo daños en estructuras celulares. En el capítulo 4 se desarrollará una discusión sobre el papel de las LEAs en la osmoprotección

- PvLEA-18: igual que en el caso anterior. Sobre su presencia en la región de elongación del hipocotilo de plántulas control, pensaríamos que juega un papel en el proceso de expansión celular, probablemente como atrapador de agua (función compatible con la de osmoestabilizador). Como veremos en el capítulo 3, a pesar de ser la región madura y la raíz las que inducen mayor acumulación de transcrito en sequía, es en las regiones de crecimiento del hipocotilo, en las plúmulas y en el cotiledón, donde la proteína más se acumula.

- PvPRPs: Las proteínas ricas en prolina (PRPs) constituyen una familia de proteínas básicas que se secretan a la pared celular [revisado en Keller, 1993]. En soja muestran diferentes patrones de expresión por desarrollo según se trate de uno u otro miembro de la familia. Por ejemplo, SbPRP1 está presente en la región de crecimiento de la raíz y en la región madura del hipocotilo y del tallo de Soja. SbPRP2 se expresa en la región apical de hipocotilos etiolados [Hong et al., 1989], y, a través de una regulación mediada por fitocromo, deja de expresarse en la región apical y pasa a expresarse en la región madura del tallo de plantas iluminadas [Marcus et al., 1991]. Ambas proteínas se inducen por daño mecánico [Suzuki et al., 1993] y, en el caso de una PRP de frijol, en respuesta a dicho estímulo o a tratamiento con elicitores, se insolubiliza en la pared por efecto de entrecruzamiento oxidativo mediado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Este entrecruzamiento también se regula por desarrollo, siendo mayor en lugares donde el crecimiento se ha detenido [Bradley et al., 1992]. Se sugiere entonces que la participación de las PRPs en la arquitectura de la pared celular puede afectar los procesos de división, elongación o diferenciación a través la regulación de su grado de extensibilidad. En los hipocotilos de frijol, la acumulación de proteínas modificadoras de la pared celular por déficit hídrico en células que ya han madurado (PvLTP-24 y PvPRPs) difícilmente tiene algo que ver con el control del crecimiento celular. Dado que estas células ya poseían una pared rígida antes de que fuesen estresadas, habría que buscar una explicación que relacione la pérdida de turgor con la necesidad proteger a las células de la región madura. La capacidad de resistencia física (sostén) de las células vegetales viene determinada tanto por la presencia de la pared como por el turgor celular generado contra ésta, por lo que la desaparición del turgor debería ser compensada con un cambio en la composición de la pared celular que aumentase su resistencia física. Las paredes de las células maduras, si bien son más rígidas que las de las regiones de crecimiento, también podrían ser

más frágiles, lo que facilitaría su "fractura" en aquéllas células que han perdido el turgor. Siendo las PRPs proteínas estructurales con capacidad para establecer puentes covalentes con otros componentes de la pared, consideramos que su función en las células que pierden el turgor es aumentar su resistencia mecánica para evitar la fractura de dichas células y, eventualmente, el doblamiento del tallo con el consecuente estrangulamiento de los vasos conductores.

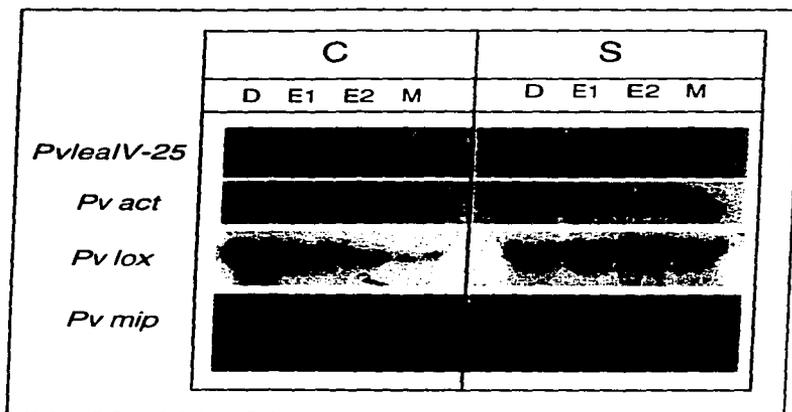
- PvLTP-24: La posible participación de las LTPs en la biosíntesis de cutícula (aislante frente a la pérdida de humedad y térmico) y en la defensa contra patógenos [Kader, 1996] tienen sentido como funciones biológicas adaptativas frente a los estreses osmótico (ver Cap.1). Siguiendo con la idea del aumento de resistencia al colapsamiento celular en la región madura de hipocotilos estresados, consideramos que las LTPs pudieran participar en la síntesis de suberina, que está constituida por compuestos aromáticos asociados a ceras (cuya síntesis requiere de la participación de LTPs). La suberina, además de favorecer la retención del agua intracelular por su naturaleza impermeable, podría disminuir la fragilidad de la pared. Esta hipótesis, además, explicaría la presencia de LTPs en las paredes de tejidos internos como el córtex (ver Cap.1), que es difícil de conciliar con la idea de que participen únicamente en la síntesis de la cutícula (en la epidermis) o como refractantes del ataque por patógenos.

- PvHSP17-19: Ya se sabe que las HSPs de bajo peso molecular (lmw-HSPs) funcionan *in-vitro* como chaperonas moleculares (ver Cap. 1). Pero, si partimos de la idea de que las células que no regulan su turgor durante el déficit hídrico son las que sufren más daño, ¿por qué en la región de división, donde las células permanecen túrgidas, es donde se acumulan las lmw-HSPs? Pensemos entonces en qué es lo que caracteriza a este tipo de células: i) están constantemente duplicando el genoma; ii) su metabolismo es mucho más acelerado, lo que supone una tasa mayor de síntesis y degradación de proteínas. La correlación entre un metabolismo acelerado y la presencia de HSPs la encontramos también en el proceso de embriogénesis, y no necesariamente asociado al estrés hídrico. Muchas evidencias sugieren que además de la función protectora que ejercen durante el estrés por calor, las HSPs juegan un papel importante en la proliferación y diferenciación celular durante el desarrollo de los organismos, en particular, durante la embriogénesis y la gametogénesis [revisar en Lindquist y Craig, 1988; Vierling, 1991]. Esto también se ha descrito en plantas, donde se ha reportado la expresión de genes de HSPs durante la embriogénesis somática [György et al., 1991; Bond y Schlesinger, 1987], la embriogénesis zigótica [Howarth, 1990; Helm y

Abernethy, 1990; Hernandez y Vierling, 1993; Coca et al., 1994), y el desarrollo del polen [Atkinson et al., 1993]. Es destacable que la mayor parte de los genes descritos en estos procesos de desarrollo corresponden a *lmw-hsps*. Nosotros hemos demostrado que, a diferencia de los demás genes, el transcrito de *Pvhsp17-19* se acumula específicamente a mayor nivel en la zona de división del hipocotilo. Esto apoyarían la idea de que la función de las *lmw-HSPs* es más requerida en células que están dividiéndose. Las *LMW-HSPs* podrían ser chaperonas eficaces cuando se requiere mantener alto nivel metabólico en condiciones de baja disponibilidad de agua. Este sería también el caso de la germinación, donde la proliferación celular se inicia a potenciales hídricos aún muy negativos, y donde según datos de Almoguera et al., (1993), las *LMW-HSPs* permanecen estables durante varios días después de la imbibición de la semilla. Esto justificaría además la necesidad de que estas proteínas se acumulen durante la embriogénesis tardía, ya que garantizaría su presencia en altas concentraciones en el momento en que se inicia la germinación. De forma similar, en el meristemo de la plántula de frijol sometida a déficit hídrico, a pesar de mantenerse la presión de turgor, la altísima acumulación de osmolitos produce los valores más negativos de  $\Psi_w$  de todo el hipocotilo (Fig. 2).

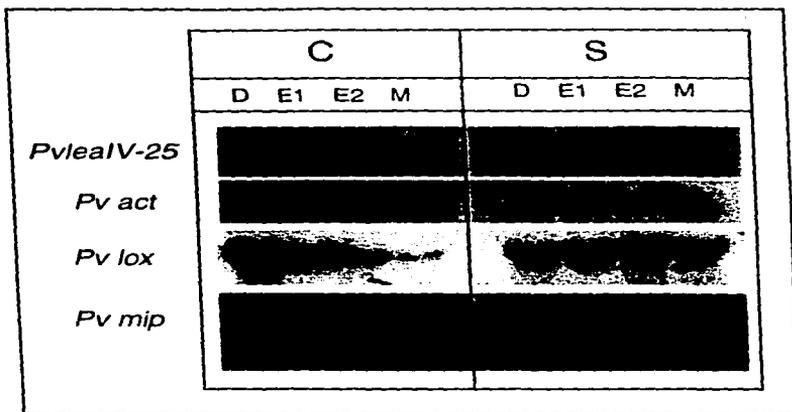
Una idea interesante a explorar se deriva de las evidencias que indican que, si bien algunos genes responden a una pérdida de turgor celular (*PvleaIV-25*, *Pvlea-18*, *Pvltip-24*, *Pvprps*), otros parecen responder a la disminución en el valor del potencial hídrico celular (*Pvhsp17-19*). No podemos descartar sin embargo que las señales responsables de la expresión diferencial de los genes en distintas regiones de crecimiento sean señales de desarrollo, como los niveles de ciertas hormonas: citoquininas en la región de división para la expresión diferencial de la *Pvhsp17-19*; y auxinas en la región de elongación para la expresión diferencial de *Pvlea-18*.

Además de nuestros clones, ensayamos la expresión de otros genes en las regiones de crecimiento de hipocotilos de *P. vulgaris* (Fig. 5). Los genes correspondientes a un canal de agua y a la lipooxigenasa se están caracterizando también en el laboratorio. El gen de actina se ensayó como marcador de la actividad celular.



**Fig. 5:** Expresión de otros genes en las diferentes regiones de crecimiento del hypocotilo control (C) o sometido a déficit hídrico (S). Presentamos como control la hibridación de uno de los clones de respuesta a sequía (*PvleaIV-25*). *Pvact* es un gen de actina. *Pvlox* corresponde a una lipooxigenasa, y *Pvmip* es un gen de una acuaporina. Todos son de *P. vulgaris*.

El gen del canal de agua presenta muy alta homología con genes de acuaporinas de otras especies que se inducen por déficit hídrico. A estas proteínas se les ha asignado un papel en la movilización de agua durante la elongación celular y se ha hipotetizado que también son importantes durante la aclimatación de una planta al déficit hídrico (ver la introducción). Nuestros datos son opuestos en los dos sentidos. El transcrito es más abundante en tejidos más maduros, y el déficit hídrico reduce levemente su expresión. Pensamos entonces que las acuaporinas estarían realizando funciones más variadas que las que le han sido asignadas. La lipooxigenasa es una proteína que participa en el metabolismo de la membrana y que está involucrada en la síntesis de ABA [Creelman, 1995]. Es un magnífico ejemplo de la regulación diferencial de la expresión génica en distintas regiones de crecimiento (Fig. 5 y Fig. 6). En condiciones control, su transcrito es proporcional a la actividad metabólica (proliferación) de las células, probablemente en relación a los procesos de biogénesis de la membrana plasmática. En condiciones de déficit hídrico, su expresión se invierte, desviándose hacia aquellos tejidos que verifican mayor pérdida de turgor. Esta nueva regulación está probablemente



**Fig. 5:** Expresión de otros genes en las diferentes regiones de crecimiento del hipocotilo control (C) o sometido a déficit hídrico (S). Presentamos como control la hibridación de uno de los clones de respuesta a sequía (*PvleaIV-25*). *Pvact* es un gen de actina. *Pvlox* corresponde a una lipooxigenasa, y *Pvmip* es un gen de una acuaporina. Todos son de *P. vulgaris*.

El gen del canal de agua presenta muy alta homología con genes de acuaporinas de otras especies que se inducen por déficit hídrico. A estas proteínas se les ha asignado un papel en la movilización de agua durante la elongación celular y se ha hipotetizado que también son importantes durante la aclimatación de una planta al déficit hídrico (ver la introducción). Nuestros datos son opuestos en los dos sentidos. El transcrito es más abundante en tejidos más maduros, y el déficit hídrico reduce levemente su expresión. Pensamos entonces que las acuaporinas estarían realizando funciones más variadas que las que le han sido asignadas. La lipooxigenasa es una proteína que participa en el metabolismo de la membrana y que está involucrada en la síntesis de ABA [Creelman, 1995]. Es un magnífico ejemplo de la regulación diferencial de la expresión génica en distintas regiones de crecimiento (Fig. 5 y Fig. 6). En condiciones control, su transcrito es proporcional a la actividad metabólica (proliferación) de las células, probablemente en relación a los procesos de biogénesis de la membrana plasmática. En condiciones de déficit hídrico, su expresión se invierte, desviándose hacia aquellos tejidos que verifican mayor pérdida de turgor. Esta nueva regulación está probablemente

relacionada con la biosíntesis de hormonas de respuesta a estrés como ácido jasmónico (JA) o ABA, en las que participa la lipooxigenasa [Creelman, 1995], mientras que la disminución de su transcrito en las regiones de división y elongación está probablemente más relacionado con la inhibición del crecimiento del hipocotilo durante el estrés. Los mismos resultados se reproducen con la aplicación de ABA a la vermiculita (Fig. 6)

D	E1	E2	M
A C S	A C S	A C S	A C S
			

**Fig. 6:** Expresión del gen de lipooxigenasa en las diferentes regiones de crecimiento del hipocotilo control (C), sometido a déficit hídrico (S) y a tratamiento con ABA (A).

La cantidad del transcrito de actina (Fig. 5), correlaciona con la tasa crecimiento tanto en condiciones control como de déficit hídrico. En hipocotilos de plántulas control, los niveles relativos del transcrito de actina están claramente disminuidos en la región madura, donde no hay proliferación, diferenciación o elongación celular. En condiciones de déficit hídrico, en la que se detiene el crecimiento, el nivel del transcrito de las regiones de división y de elongación disminuye al nivel presente en la región madura. El comportamiento de los genes de la lipooxigenasa y de actina durante el déficit hídrico en las zonas de crecimiento del hipocotilo puede ser un efecto indirecto de la inhibición del crecimiento o parte de los mecanismos moleculares empleados por la plántula para detener el crecimiento.

#### IV DATOS ADICIONALES: OTROS CLONES DE ADNc

Hasta ahora hemos mostrado la descripción de 5 de los 15 clones de ADNc que inicialmente comenzaron a caracterizarse (Tabla.1).

Tabla 1: Descripción de los clones de ADNc

CLON ADNc	INDUCIBILIDAD	NOMBRE	PRODUCTO
CLON 4	?		Flavonol sintasa
CLON 7	NO		RNAr-25S-PoliA
CLON 8	(-)		rbcS1
CLON12	(+)	(rsP12)	PRP
CLON15	NO		?
CLON18	(+)	(rsP18)	nueva LEA
CLON19	(+)	(rsP19)	Imw-HSP
CLON20	NO		?
CLON24	(+)	(rsP24)	LTP
CLON25	(+)	(rsP25)	LEA-IV
CLON27	(+)	idem (rsP18)	
CLON31	(+)	idem (rsP24)	
CLON32	(-)		rbcS2
CLON37	(+)	(rsP37)	PRP2
CLON39	(+)	idem (rsP18)	

Los clones de ADNc que no aparecen en el reporte dejaron de caracterizarse por diversas razones. Los clones 27, 31 y 39 resultaron ser idénticos en secuencia a otros que estaban siendo estudiados. Los clones 7, 15 y 20 no eran inducibles por sequía, al menos en las condiciones experimentales que estábamos usando (plántulas de frijol transplantadas a vermiculita sub-hidratada. Ver el apartado de Materiales y Métodos del artículo). La caracterización parcial del resto los clones se describe a continuación.

### 1.1 Clon 7: ADN-ribosomal 25S poliadenilado

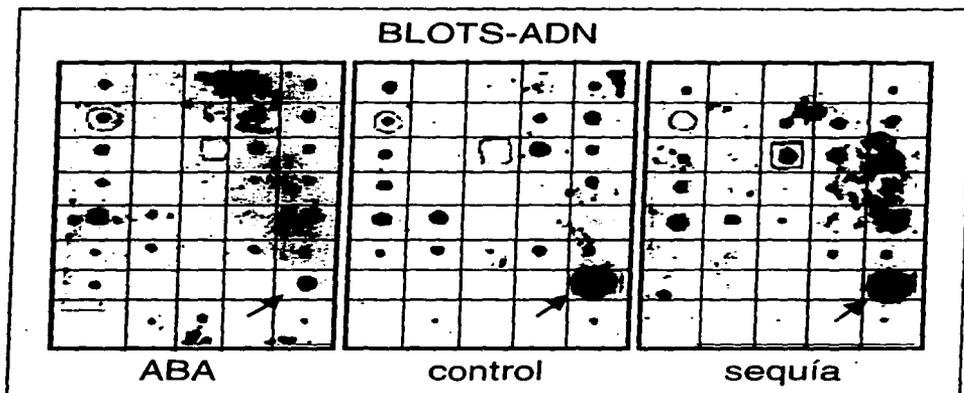
La secuenciación completa del clon 7 nos mostró que se trataba del extremo 3' del gen que transcribe para el ARN ribosomal 25S (Fig. 7). Probablemente se trate de un artefacto de la construcción de la genoteca de ADNc. En la Figura 7 se muestra el alineamiento de secuencia del clon 7 con el extremo 3' del gen ribosomal 25S de *P. sativum*. La última base del gen ribosomal 25S en el alineamiento corresponde a la última base del clon 7 antes de la cola de poli-A (Fig. 7).

Clon7 cDNA	1	GACAGGTTAG	TTTTACCCTA	CTGATGACAG	GTGTCGCAAT	AGTAATTCAA	50
<i>Pisum sativum</i>	1	GACAGGTTAG	TTTTACCCTA	CTGATGACAG	-TGTCGCAAT	AGTAATTCAA	49
ARNr-25S							
	51	CCTAGTACGA	GAGGAACCGT	TGATTGCGAC	AATTGGTCAT	CGGCCTTGGT	100
	50	CCTAGTACGA	GAGGAACCGT	TGATTGCGAC	AATTGGTCAT	CGGCCTTGGT	99
	101	TGAAAAGCCA	GTGGCGCGAA	GCTACCGTGC	GTTGGATTAT	GACTGAACGC	150
	100	TGAAAAGCCA	GTGGCGCGAA	GCTACCGTGC	GTTGGATTAT	GACTGAACGC	149
	151	CTCTTAGTCA	GAATCCGGGC	TAGAAGCGAT	GCGTGCGCC-	-----	189
	150	CTCTTAGTCA	GAATCCGGGC	TAGAAGCGAT	GCGTGCGCC	GCCGTTCACT	199
	190	---GACCAG	CAGTAGGGGC	CTTGGCCCCA	GAGGCACGTG	CCTGTGGTG	235
	200	TGCCGACCAG	CAGTAGGGGC	CTTGGCCCC-A	GAGGCACGTG	CC-GTGGTG	247
	236	-ACCCTCGTA	AGGTGAATCA	GCCTTGCAG	ACGCCCT-TGA	AGCGCAATT	283
	248	TACCCT-GTA	AGGTGGATGA	GCCTTGCAGG	ACAC-TATGA	AACGCAATT-	294
	284	CC-ATCGAGC	GG-GG--AGA	ATCCTTTCGA	GACGACTTAA	ATACG-GAC-	327
	295	CCTATTGAGC	GCGGGGTAGA	ATCCTTTCGA	GACGACTTAA	ATACGCGACA	34
	328	GGSTATTGTA	AGTGGCAGAG	TGGCCCTGCT	GCCACGATCC	ACTGAGATTC	377
	345	GGSTATTGTA	AGTGGCAGAG	TGGCCCTGCT	GCCACGATCC	ACTGAGATTC	394
	378	AGCCCTTGTC	GCTTCGATTC	GTAAAAAAA	AAAAAAA		399
	395	AGCCCTTGTC	GCTTCGATTC	GT			416

**Fig. 7:** Comparación de la secuencia del gen ARNr-25S de *Pisum sativum* con el clon 7 de ADNc. La poliadenilación del clon7 comienza después de la última base del gen ribosomal.

Los experimentos de hibridación diferencial reflejan el grado de acumulación de los transcritos de los clones de ADNc en diversas condiciones medioambientales, así como la abundancia relativa entre unos y otros transcritos. En la Figura 8 se muestran los datos de hibridación diferencial de algunos de los clones de ADNc realizados por la técnica de 'blots' de ADN [Covarrubias y Garcíarrubio, 1993]. Se puede observar que el transcrito más abundante de todos es el que corresponde al clon 7 de ADNc (marcado con una flecha), tanto en la condición control como en la condición de déficit hídrico. También es notoria la fuerte disminución de dicho transcrito en plantas tratadas con ABA. En los rastreos de los bancos de datos encontramos que

secuencias de ADN correspondientes a esta región del ADN ribosomal están formando parte del líder de dos genes de estrés de dos especies diferentes. Se trata del líder de dos genes de choque térmico, el gen *hsp86* de ratón y el gen *cMHSP18-3* de maíz. La secuencia líder "ribosomal" presente en el clon de maíz es reversa-complementaria a la secuencia del gen ribosomal de maíz. Aunque todo esto puede tratarse de un artefacto, por ahora no podemos explicar el fenómeno de poliadenilación de un transcrito ribosomal, y no podemos descartar que tenga un significado biológico, tal vez relacionado con la regulación por ABA de la traducibilidad de los transcritos.



**Fig. 8:** Hibridación diferencial de algunos clones del banco de ADNc por la técnica de blots de ADN. Se fijan a tres filtro cantidades iguales de ADN de diversos representantes del banco de ADNc. A partir de tejido de plantas control, sometidas a tratamiento con ABA o a déficit hídrico, se obtiene ARN-poliA. A continuación se retrotranscribe la primera cadena de ADNc de cada "pool" de ARN-poliA al mismo tiempo que se marca radiactivamente dicho ADNc. Cada filtro se va a hibridar contra cada "pool" marcado de ADNc, lo que va a permitir determinar la cantidad relativa de cada ARNm correspondiente a cada ADNc en las tres condiciones experimentales. [Covarrubias y Garcíarrubio, 1993]

### 1.2. Clon 4: homólogo a una flavonol sintetasa

En la Fig. 9A mostramos el alineamiento del clon 4 con el gen que codifica para una flavonol sintetasa en *Petunia híbrida* [Holton et al., 1993]. El

especie. El clon 4 de ADNc es muy chico, por lo que probablemente es parcial. Aunque la región de alineamiento es muy corta, consideramos significativo que la máxima identidad se concentra en la región codificante del gen de la flavonol sintasa y que en ambos genes dicha zona de alineamiento corresponde al extremo 3'. Pero el dato que más refuerza el hecho de que el clon 4 corresponde a un gen flavonol sintasa de *P. vulgaris* es el grado de identidad de la secuencia de aminoácidos obtenida de la secuencia parcial del clon 4 comparada con el extremo carboxilo de la flavonol sintetasa de *P. híbrida* (Fig. 9B). La caracterización de este clon se detuvo porque inicialmente no logramos detectar su transcrito mediante experimentos tipo northern a partir de ARN total de plántulas de frijol y porque la caracterización de otros clones avanzaba más rápidamente. Consideramos de interés retomar su estudio porque, recientemente, A. Garay en nuestro laboratorio ha comprobado que un gen de respuesta a estrés osmótico en levadura es homólogo a genes de plantas que participan en la vía síntesis de flavonoides.

### 1.3. Clones 8 y 32: Ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa (rubisco)

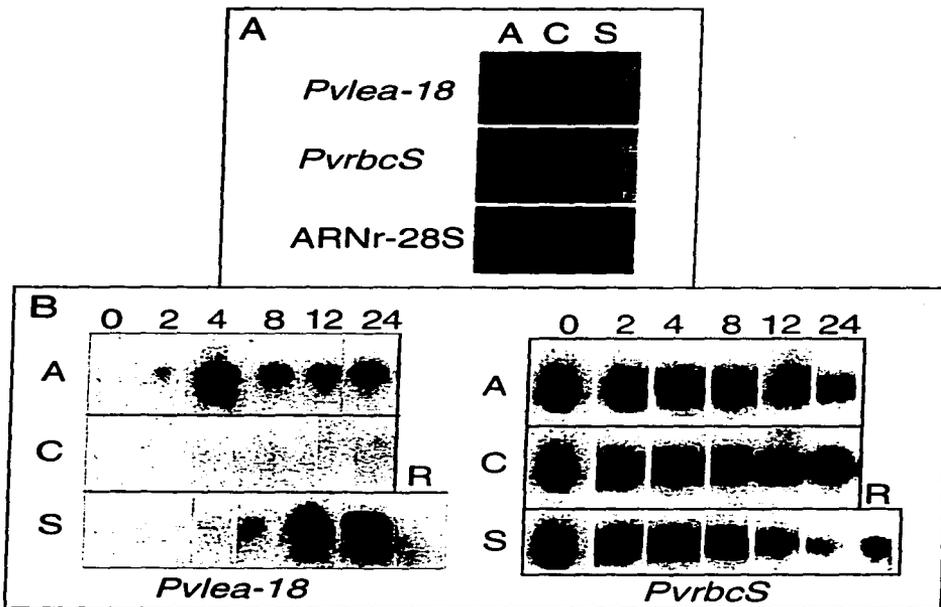
Pensamos que sería interesante también analizar algunos clones cuya expresión se viese reprimida por déficit hídrico y ABA (grupo 5). Para ello procedimos a secuenciar parcialmente y a obtener datos de la expresión de los clones 8 y 32 (Fig. 1). La secuencia parcial del clon 8 alineó perfectamente con parte de la región 5' no codificante (5'-UTR) y parte de la región codificante del gen I de la subunidad pequeña de la enzima ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa (*rbcS-I*) de *P. vulgaris* (dato no mostrado). Existen en dicha especie al menos 3 genes (*rbcS I-III*) que codifican para tres isoformas de la proteína 'rubisco'. La secuencia parcial del clon 32 alineó con parte de la región codificante del gen *rbcS-II* de *P. vulgaris*, en una zona más próxima al extremo 3' de dicho gen (dato no mostrado). Estos datos indican que los genes *rbcS* son probablemente los más representados en el grupo de genes inhibidos por déficit hídrico.



acumulación de los transcritos de los genes *rbcS* se regula negativamente por aplicación de ABA en embriones de trigo y guisante y, por déficit hídrico, a través de la acción de ABA, reprime su transcripción en hojas de tomate [Bartholomew et al., 1991].

Tenemos datos preliminares referentes la influencia del déficit hídrico y la aplicación de ABA sobre la acumulación de los transcritos de los genes *rbcS* en plántulas de *P. vulgaris*. Nuestros datos indican que el déficit hídrico reprime fuertemente la acumulación de dicho transcrito en plántulas etioladas de *P. vulgaris* y que ABA no es la mediadora de esta regulación negativa. En la Fig. 10A podemos ver una hibridación tipo northern donde se compara la acumulación de los transcritos de *rbcS* en plántulas control respecto a plántulas tratadas 24h con déficit hídrico o ABA. Aparentemente, ABA no afecta el nivel de los transcritos mientras que el déficit hídrico lo hace muy severamente. Para corroborar este dato se realizó una cinética de acumulación de los transcritos a diferentes tiempos después de transplantar plántulas etioladas de *P. vulgaris* a vermiculita control, vermiculita deficiente en agua y vermiculita irrigada con ABA 0.1 mM (Fig. 10B) (ver materiales y métodos en la sección IV de éste capítulo). Aunque sí se observa ahora un grado de disminución del transcrito en plántulas tratadas con ABA después de 24h, el efecto es más rápido y severo en plántulas sometidas a déficit hídrico. En este experimento, se analizó como control la evolución del transcritos correspondientes a *Pvlea-18*, ya descrito en la sección anterior, y que responde positivamente al déficit hídrico o a tratamiento con ABA. En los genes donde ABA es mediador de la respuesta a sequía se puede observar que la respuesta a ABA es más rápida que a déficit hídrico (Fig. 10B). Así, el gene *Pvlea-18* responde positivamente a la aplicación de ABA desde 2h después de su aplicación, mientras que en el caso de *rbcS*, la regulación negativa por ABA comienza a ser evidente a las 24h de tratamiento. Sin embargo, a las 12h de trasplante a vermiculita sub-hidratada se observa una disminución en los niveles de transcrito de *rbcS*. Estos datos sugieren que, a diferencia de lo que se ha reportado en hojas de guisante, ABA no parece estar regulando directamente la abundancia del transcrito *rbcS* en plántulas de *P. vulgaris*, por lo que deben existir señales alternativas a esta hormona que están regulando negativamente la síntesis de la subunidad pequeña de la enzima rubisco durante déficit hídrico en dicho sistema. Quizá la diferencia de comportamiento entre lo reportado en guisante y frijol es que en el primer caso se usan hojas iluminadas, y el nuestro es un sistema etiolado. El principal regulador de los genes implicados en la fotosíntesis es la luz, efecto que nosotros quitamos en nuestros experimentos para evitar interferencias con los efectos directos de déficit hídrico o ABA. Es posible que ABA regule negativamente la expresión de los genes activados por fitocromo, que es el

fitocromo, que es el sistema que regula la expresión por luz en las plantas. Recordemos, por ejemplo, que el elemento de regulación ACGT está presente tanto en los promotores de genes que responden a ABA (caja ABRE), como en los promotores de los genes que responden a luz (caja G).



**Fig. 10:** Regulación de la acumulación del transcrito del gen *rbcS* por efecto del déficit hídrico y de la hormona ABA. 5A: Acumulación de los transcritos en plántulas de 3d transplantadas a vermiculita bien hidratada con una solución de ABA (0.1 mM) (A); bien hidratada con agua (C); o deficiente en agua (S). 5B: Acumulación de los transcritos después de transplantar plántulas de 5d a vermiculita en las condiciones descritas en 5A. Una vez transplantadas, se colectaron plántulas a las 0, 2, 4, 8, 12 y 24 horas. Plántulas sometidas a déficit hídrico durante 24 h fueron rehidratadas y colectadas 12h después (R).

## **V MATERIALES Y MÉTODOS**

Los siguientes procedimientos experimentales están descritos en el artículo (sección II):

- Material vegetal y condiciones de crecimiento
- Determinación de la tasa de crecimiento del hipocotilo de plántulas de *P. vulgaris*.
- Medición de los valores del potencial hídrico de la vermiculita.
- Aislamiento de ARN y análisis tipo northern
- Marcaje radiactivo de sondas de ADN.
- Construcción de la genoteca de ADNc y aislamiento de clones inducidos por déficit hídrico y ABA.
- Análisis de secuencia del ADN.
- Medición de los potenciales hídrico y osmótico de las regiones de crecimiento de los hipocotilos de plántulas de *P. vulgaris*.

Respecto al análisis de la expresión de genes en las regiones de crecimiento de hipocotilos de *P. vulgaris*, se dividieron las zonas de crecimiento descritas anteriormente cortando los hipocotilo de plántulas con bisturí. Las secciones eran inmediatamente almacenadas en presencia de nitrógeno líquido y guardadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  antes de ser homogeneizadas con mortero. El material homogeneizado era usado para la extracción de ARN total y su posterior análisis en experimentos tipo northern.

## VI CONCLUSIONES

1. Hemos clonado y caracterizado 6 genes que responden a déficit hídrico y a la fitohormona ABA en *P. vulgaris*. El análisis de sus secuencias ha demostrado que codifican para una proteína de embriogénesis tardía (*PvleaIV-25*), para una proteína de choque térmico de bajo peso molecular (*Pvhsp17-19*), para una transferasa de lípidos (*Pvltp-24*) y para dos proteínas ricas en prolina de la pared celular (*Pvprp2-37* y *Pvprp-12*).

2. El gen correspondiente al clon rsP18 codifica para una proteína de secuencia desconocida, pero que posee las características estructurales propias de una proteína LEA, como alto contenido en glicinas y en aminoácidos cargados, y alta presencia de regiones no estructuradas a lo largo del polipéptido.

3. Las características de expresión del gen correspondiente al clon rsP18 también se ajustan a la de los genes de las proteínas LEA: fuerte acumulación del transcrito en la semilla seca e inducibilidad por ABA y déficit hídrico en los tejidos vegetativos. Hemos clasificado entonces a este gen como un nuevo componente de los genes de embriogénesis tardía de plantas, y lo hemos llamado *Pvlea-18*.

4. Todos los genes muestran una expresión transitoria durante la respuesta de la planta a déficit hídrico moderado ( $\Psi_w = -3.5$  bares), que es máxima en torno a las 16h o 24h de tratamiento.

5. La rehidratación de las plantas produjo respuestas variadas entre los diferentes genes. Mientras que los transcritos de algunos desaparecen pocas horas después de la rehidratación (*PvleaIV-25* y *Pvlea-18*), otros mantienen o incluso reinducen transitoriamente su ARNm (*Pvltp-24* y *Pvprps*), dándonos una idea de la diversidad de estímulos que participan en la regulación de algunos de los genes.

6. Establecimos algunos de los estímulos diferentes al déficit hídrico que participan en la inducción de estos genes: factores de desarrollo (*pvlea-18*, *Pvhsp17-19*, *Pvltp-24* y *Pvprps*); daño mecánico (*Pvltp-24* y *Pvprps*) y choque térmico (*Pvhsp17-19* y *PvleaIV-25*).

7. Salvo el gen correspondiente a la LTP, todos los genes acumulan una mayor cantidad de transcrito en la raíz de plantas sometidas a déficit hídrico, lo que indica una mayor capacidad de respuesta de este órgano a

estas condiciones de estrés.

8. La inducción de estos genes por ABA o sequía está subordinada a un control específico de desarrollo (expresión diferencial según el órgano de que se trate o según el estadio de desarrollo de los tejidos dentro de un órgano).

9. La mayor parte de los genes se inducen mayoritariamente en tejidos en los que se verifica una pérdida de turgor. Sin embargo, el gen *Pvhsp17-19* se expresa en aquellos tejidos que verifican valores muy negativos de potencial hídrico, aunque no haya pérdida de turgor.

10. Además de su regulación por déficit hídrico, el gen *Pvlea-18* se expresa en la región de elongación del hipocotilo de plántulas bien hidratadas.

11. En nuestras condiciones experimentales, registramos una disminución del 81 % en la tasa de crecimiento de plántulas de frijol sometidas a 24h de déficit hídrico. Dado que las regiones de división y de elongación del hipocotilo mantienen intacta la presión de turgor, consideramos que la plántula inhibe su crecimiento durante el estrés.

12. Aparte de modificar la composición de sus paredes celulares, las plántulas podrían inhibir el crecimiento del hipocotilo durante el déficit hídrico a través de la regulación negativa de genes implicados en la maquinaria general del crecimiento celular, como la síntesis de actina y el metabolismo de la membrana plasmática.

## VII BIBLIOGRAFÍA

- Alamillo, J., Almoguera, C., Brtels, D., and Jordano, J. (1995). Constitutive expression of small heat shock proteins in vegetative tissues of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Mol. Biol.* **29**:
- Almoguera, C., Coca, M.A., and Jordano, J.(1993). Tissue specific expression of sunflower heat shock proteins in response to water stress. *Plant J.* **4**: 947-58.
- Almoguera, C., and Jordano, J. (1992). Developmental and environmental concurrent expression of sunflower dry-seed store low-molecular weight heat-shock-protein and leaf mRNAs. *Plant Mol. Biol.* **19**: 781-792.
- Bartholomew, D., Bartley, G., and Scolnick, P.A. (1991). Abscisic acid control of *rbcS* and *cab* transcription in tomato leaves. *Plant Physiol.* **96**: 291-296.
- Bohnert, H.J., Nelson, D.E., and Jensen, R.G.(1995). Adaptation to environmental stresses. *Plant Cell* **7**: 1099-1111.
- Borkird, C., Simoens, C., Villarroel, R., and Van-Montagu, M(1991). Gene expression associated with water stress adaptation of rice cells and identification of two genes as hsp70 and ubiquitin. *Physiol. Plant.* **82**: 449-457.
- Botella, M.A., Quesada, M.A., Konowicz, A.K., Bressan, R.A., Pliego, F., Hasegawa, P.M., and Valpuesta, V.(1994). Characterization and *in situ* localization of a salt-induced tomato peroxidase mRNA. *Plant Mol. Biol.* **25**: 105-114.
- Bradley, D.J., Kjellbom, P., and Lamb, C.J. (1992). Elicitor and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell* **70**: 21-30.
- Bray, E.A. (1991). Regulation of gene expression by endogenous ABA during drought stress. In *Abscisic Acid, physiology and biochemistry*. W. J. Davies and H. G. Jones, Eds. (Lancaster LA1 4YQ, UK. Bios Scientific Publisher). pp. 81-96.
- Bray, E.A. (1993). Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol.* **103**: 1035-1040.
- Chen, Z., Hsing, Y.C., Lee, P., and Chow, T. (1992). Nucleotide sequence of a soybean cDNA encoding a 18 kilodalton late embryogenesis abundant protein. *Plant Physiol.* **99**: 773-774.
- Chrispeels, M.J., and Maurel, C. (1994). Aquaporins: the molecular basis of facilitated water movement through living plant cells? *Plant Physiol.* **105**: 9-13.
- Church, G.M., and Gilbert, W. (1984). Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 1991-1995.
- Coca, M.A., Almoguera, C., and Jordano, J. (1994). Expression of sunflower low-molecular-weight heat-shock proteins during embryogenesis and persistence after germination: localization and possible functional implications. *Plant Mol. Biol.* **25**: 479-492.
- Cosgrove, D.J. (1996). Plant cell enlargement and the action of expansins. *Bioessays* **18**:

**Covarrubias, A.A., Ayala, J.W., Reyes, J.L., Hernandez, M., and Garcarrubio, A. (1995).** Cell-wall proteins induced by water deficit in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Plant Physiol.* **107:** 1119-1128.

**Covarrubias, A.A., and Garcarrubio, A. (1993).** Molecular characterization of the response to water deficit in *Phaseolus vulgaris* L. In *Phaseolus Beans Advanced Biotechnology Research Network (BARN)*. W. M. Roca, J. E. Mayer, M. A. Pastor-Corrales and J. Tohme. Eds. pp.

**Creelman, R.A., Mason, H.S., Bensen, R.J., Boyer, J.S., and Mullet, J.E. (1990).** Water deficit and abscisic acid cause differential inhibition of shoot versus root growth in soybean seedlings. *Plant Physiol.* **92:** 205-214.

**Creelman, R.A., and Mullet, J. (1991).** Water deficit modulates gene expression in growing zones of soybean seedlings. Analysis of differentially expressed cDNAs, a new  $\beta$ -Tubulin gene, and expression of genes encoding cell wall proteins. *Plant Mol. Biol.* **17:** 591-608.

**de Vries, S., Hoge, H., and Bisseling, T. (1991).** Isolation of total and polysomal RNA from plant tissues. In *Plant Molecular Biology Manual*. S. B. Gelvin, R. A. Schilperoot and D. P. S. Verma. Eds. (Dordrecht (The Netherlands), Kluwer Academic). pp.

**Devereux, J., Haebertli, P., and Smithies, O. (1984).** A comprehensive set of sequence analysis programs for the vax. *Nucleic Acid Res.* **12:** 387-395.

**Dure III, L. (1993).** Structural motifs in Lea proteins. In *Plant responses to cellular dehydration during environmental stress*. T. J. Close and E. A. Bray, Eds. (Rockville, MD, American Society of Plant Physiologists). pp. 91-103.

**Dure III, L., Greenway, S.C., and Galau, G.A. (1981).** Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: XIV. Changing mRNA populations as shown by *in vitro* and *in vivo* protein synthesis. *J. Biochem.* **20:** 4162-4168.

**Ecker, J.R., and Davis, R.W. (1987).** Plant defense genes are regulated by ethylene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84:** 5202-5206.

**Esaka, M., Hayakawa, H., Hashimoto, M., and Matsubara, N. (1992).** Specific and abundant secretion of a novel hydroxyproline-rich glycoprotein from salt-adapted winged bean cells. *Plant Phys.* **100:** 1339-1345.

**Espartero, J., Pintor-Toro, J.A., and Pardo, J.M. (1994).** Differential accumulation of S-adenosylmethionine synthetase transcripts in response to salt stress. *Plant Mol. Biol.* **25:** 217-227.

**Frensch, J., and Hsiao, T.C. (1995).** Rapid response of the yield threshold and turgor regulation during adjustment of root growth to water stress in *Zea mays*. *Plant Physiol.* **108:** 303-312.

**Gómez-Cárdenas, A., Tadeo, F.R., Talon, M., and Primo-Millo, E. (1996).** Leaf abscission induced by ethylene in water-stressed intact seedlings of Cleopatra mandarin requires previous abscisic acid accumulation in roots. *Plant Physiol.* **112:** 401-408.

**Holton, T.A., Brugliera, F., and Tanaka, Y. (1993).** Cloning and expression of

flavonol synthase from *Petunia hybrida*. *Plant J.* **4**: 1003-1010.

Hong, J.C., Nagao, R.T., and Key, J.L. (1987). Characterization and sequence analysis of a developmentally regulated putative cell wall protein gene isolated from soybean. *J. Biol. Chem.* **262**: 8367-8376.

Hong, J.C., Nagao, R.T., and Key, J.L. (1990). Characterization of a proline-rich cell wall protein gene family of soybean. *J. Biol. Chem.* **265**: 2470-2475.

Ingram, J., and Bartels, D. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**: 377-403.

Iraki, N.M., Singh, N., Bressan, R.A., and Carpita, N.C. (1989). Cell walls of tobacco cells and changes in composition associated with reduced growth upon adaptation to water and saline stress. *Plant Physiol.* **91**: 48-53.

Jones, H., Leigh, R.A., Tomos, A.D., and Wyn Jones, R.G. (1987). The effect of abscisic acid on cell turgor pressures, solute content and growth of wheat roots. *Planta* **170**: 257-262.

Kader, J.C. (1996). Lipid-transfer proteins in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**: 627-654.

Keller, B. (1993). Structural cell wall proteins. *Plant Physiol.* **101**: 1127-1130.

Kiyosue, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (1994). Cloning of cDNAs for genes that are early-responsive to dehydration stress (ERDs) in *Arabidopsis thaliana* L: Identification of three ERDs as HSPs cognate genes. *Plant Mol. Biol.* **25**: 791-798.

Koizumi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Tsuji, H., and Shinozaki, K. (1993). Structure and expression of two genes that encode distinct drought-inducible cysteine proteinases in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **129**: 175-182.

Kononowicz, A.J., Raghobama, K.G., Casas, A.M., Reuveni, M., Watad, A.-E.A., Liu, D., Bressan, R.A., and Hasegawa, P.M. (1993). Osmotin: regulation of expression and function. In *Plant responses to cellular dehydration during environmental stress*. T. J. Close and E. A. Bray, Eds. (Rockville, MD, American Society of Plant Physiologists). pp. 144-158.

Lauzon, L.M., Helm, K., and Vierling, E. (1990). A cDNA clone from *Pisum sativum* encoding a low molecular weight heat shock protein. *Nucleic Acid Res.* **18**: 4274-4274.

Lee, G.J., Pokala, N., and Vierling, E. (1995). Structure and *in vitro* molecular chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from pea. *J. Biol. Chem.* **270**: 10432-10438.

Lindquist, S., and Craig, E.A. (1988). The heat shock proteins. *Ann. Rev. Genet.* **22**: 631-677.

Ludwig-Muller, J., Schubert, B., and Pieper, K. (1995). Regulation of IBA synthetase from maize (*Zea mays* L.) by drought stress and ABA. *J. Exp. Bot.* **46**: 423-432.

Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. In Editor. Eds. (Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory). pp. Pages.

- Manzara, T., Carrasco, P., and Gruissem, W.**(1991). Developmental and organ-specific changes in promoter DNA-protein interactions in the tomato *rbcS* gene family. *Plant Cell* 3: 1305-1316.
- Molina, A., and Garcia-Olmedo, F.**(1993). Developmental and Pathogen induced expression of three barley genes encoding lipid transfer proteins. *Plant Journal* 4: 983-991.
- Niu, X., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., and Pardo, J.M.**(1995). Ion homeostasis in NaCl stress environment. *Plant Physiol.* 109: 735-742.
- Niu, X., Zhu, J.K., Narasimhan, M.L., Bressan, R.A., and Hasegawa, P.M.** (1993). Plasma-membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene expression is regulated by NaCl in cells of the halophyte *Atriplex nummularia* L. *Planta* 190: 433-438.
- Nonami, H., and J.S., B.** (1989). Turgor and growth at low water potentials. *Plant Physiol.* 89: 798-804.
- Raschke, E., Baumann, G., and Schoeffel, F.** (1988). Nucleotide sequence analysis of soybean small heat shock protein genes belonging to two different multigene families. *J. Mol. Biol.* 199: 549-557.
- Ryder, T.B., Cramer, C.L., Bell, J.N., Robbins, M.P., Dixon, R.A., and Lamb, C.J.** (1994). Elicitor rapidly induces chalcone synthase mRNA in *Phaseolus vulgaris* cells at the onset of the phytoalexin defense response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 81: 5724-5728.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T.**(1989). Molecular cloning. A laboratory manual. In Editor. Eds. (Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press). pp. Pages.
- Showalter, A.M.** (1993). Structure and function of plant cell wall proteins. *The Plant Cell* 5: 9-23.
- Smirnoff, N., and Cumbes, Q.J.**(1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* 28: 1057-1060.
- Smith, C.** (1997). Departamento de Biología Molecular de Plantas.
- Taiz, L., and Zeiger, E.** (1991). Stress Physiology. *Plant Physiology*. Chapter 14.
- Tchang, F., This, P., Stiefel, V., Arondel, V., Morch, M.D., Pages, M., Puigdomenech, P., Grellet, F., Delseny, M., and Bouillon, P.** (1988). Phospholipid transfer protein: full-length cDNA and amino acid sequence in Maize. 263 32: 16849-16855.
- Thomas, T.L., Vivekananda, J., and Bogue, M.A.**(1991). ABA regulation of gene expression in embryos and mature plants. In *Abcisic Acid, physiology and biochemistry*. W. J. Davies and H. G. Jones. Eds. (Lancaster LA1 4YQ. UK. Bios Scientific Publisher). pp. 125-134.
- Torres-Schumann, S., Godoy, J.A., and Pintor-Toro, J.A.**(1992). A probable lipid transfer protein gene is induced by NaCl in stems of tomato plants. *Plant Mol. Biol.* 18: 749-757.
- Umeda, M., Hara, C., Matsubayasi, Y., Li, H.H., Liu, Q., Tado Koro, F., Aotsuka, S., and Uchimilla, H.** (1994). Expressed sequence tags from cultured cells of rice (*Oryza*

*sativa L.*) under stressed conditions: analysis of transcripts of genes engaged in ATP-generating pathways. *Plant Mol. Biol.* 25: 469-478.

Vierling, E. (1991). The roles of heat shock proteins in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 570-620.

White, A.J., Dunn, M.A., Brown, K., and Hughes, M.A. (1994). Comparative analysis of genomic sequence and expression of a lipid transfer protein gene family in winter barley. *J. Exp. Bot.* 45: 1885-1892.

Zhang, S., and Mehdy, M.C. (1994). Binding of a 50-kd protein to a U-rich sequence in a mRNA encoding a proline rich protein that is destabilized by fungal elicitor. *The Plant Cell* 6: 135-145.

# Plant Gene Register PGR97-124

Francisco Campos, Rosa M. Solórzano, Alejandro Garcíarrubio, José M. Colmenero-Flores and Alejandra A. Covarrubias (1997) A *Phaseolus vulgaris* cDNA encoding a putative aquaporin (Accession No. U97023) (PGR97-124). *Plant Physiol.* **115**: 313

---

## **A *Phaseolus vulgaris* cDNA encoding a putative aquaporin (Accession No. U97023).**

Francisco Campos, Rosa M. Solórzano, Alejandro Garcíarrubio, José M. Colmenero-Flores and Alejandra A. Covarrubias(\*).

Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, UNAM. Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62250, México.

(\*)Corresponding author: E-mail crobles@ibt.unam.mx; FAX (52)(73)139988

Footnote: This work was supported by CONACyT grant 0131P-N to AAC.

The Major Intrinsic Protein (MIP) is a large family of integral membrane proteins with six putative transmembrane domains conserved throughout evolution. Members of this family have been identified in many organisms, ranging from bacteria to mammals. Functional data has been reported for some members of the different subfamilies (Chrispeels and Agre, 1994; Agre *et al.*, 1995). There are MIPs that are thought to constitute relatively simple but selective channels for a variety of ions or small uncharged molecules. In the case of the bacterial glycerol facilitator GIpF, it has been shown that it facilitates glycerol, other polyhydric alcohols, urea and glycine uptake into *E. coli* (Maurel *et al.*, 1994). For the bovine prototype MIP26, there is data showing that it serves as voltage-dependent anion channel (Ehring *et al.*, 1990). Other MIP members have been shown to facilitate transport of water in plants and animals which are known as aquaporins (Chrispeels and Agre, 1994; Chrispeels and Maurel 1994). Different subfamilies have been identified by sequence comparisons which allows to distinguish animal and plant genes and that may help to recognize different functions of MIPs (Yamada *et al.*, 1995). Interested in the function of proteins involved in water or solutes transport, we isolated a member of the MIP gene-family from common bean (*Phaseolus vulgaris*) using as probe a pea cDNA encoding a putative turgor responsive MIP (Guerrero *et al.*, 1990). The sequence analysis of the putative PvMip-1 indicated that it can be classified within the subfamily of plant MIP genes encoding aquaporins. Northern-blot analysis showed that the PvMip-1 transcript is present in roots, leaves and stems. In spite of the high homology with the pea turgor responsive PsMip-7a cDNA, drought and ABA treatments do not lead to an induction of the PvMip-1 transcript accumulation. In contrast, a reduction in the PvMip transcript levels was detected in response to long water deficit treatments. Similar expression patterns have been found in some *A. thaliana* aquaporins transcripts (Kammerloher *et al.*, 1994).

---

### **Acknowledgments:**

We thank Dr. J. E. Mullet for the gift of the pea 7a cDNA clone and Dr. J. Padilla for the reading of the manuscript.

---

**Table 1. Characteristics of a cDNA from common bean encoding a putative aquaporin.**

**Organism:**

*Phaseolus vulgaris* L. cv negro Jamapa.

**Gene product:**

PvMip-1 cDNA encodes a putative water-channel protein (aquaporin) and belongs to the Major Intrinsic Protein (MIP) family.

**Source:**

A cDNA library in lambda gt11 was constructed from poly(A+) RNA of water deficit- and ABA-treated 21-day-old bean plants.

**Method of isolation:**

Library was screened by using the turgor-responsive 7a cDNA clone from pea (Guerrero *et al.*, 1990) as hybridization probe. A full-length cDNA clone was isolated and subcloned into pBluescript. The complete nucleotide sequence of both strands was obtained.

**Characteristics of cDNA:**

PvMip-1 cDNA has a length of 1213 bp from which 312 bp correspond to the 3'-untranslated region. PvMip-1 cDNA shows 80% homology, within the coding region, with the pea cDNA clone 7a previously identified as a putative aquaporine.

**Structural features of the deduced protein:**

The open reading frame of the PvMip-1 cDNA clone encodes a protein of 289 amino acids with a predicted molecular mass of 30.8 kDa and isoelectric point of 8.3. The deduced protein sequence shows six putative transmembrane regions and the MIP family consensus sequence NPA. At the amino acid level, PvMip-1 exhibit an identity of 89.5% with the 7a protein from pea (Guerrero *et al.*, 1990) and 88.5% with the TMP-C A. thaliana transmembrane protein (Kinoshita *et al.*, 1994)

**Expression characteristics:**

Similar levels of the 1.2-kb PvMip-1 transcript were detected in well-irrigated and water-limited etiolated seedlings and mature green plants. Additionally, the PvMip-1 transcript was not responsive to ABA treatments and was absent in bean dry seeds and nitrogen-fixing nodules.

---

**Literature Cited**

**Agre P, Brown D, Nielsen S (1995)** Aquaporin water channels: unanswered questions and unresolved controversies. *Curr Opin Cell Biol* 7: 472-483.

**Chrispeels MJ, Agre P (1994)** Aquaporins: Water channel proteins of plant and animal cells. *Trends Biol Sci* 19:421-425.

**Chrispeels MJ, Maurel C (1994)** Aquaporins: the molecular basis of facilitated water movement through living plant cells? *Plant Physiol* 105: 9-13

**Ehring GR, Zampighi G, Horwitz J, Bok D, Hall JE (1990)** Properties of channels reconstituted from major intrinsic protein of lens fiber membranes. *J Gen Physiol* 96, 631-644.

**Guerrero FD, Jones JT, Mullet JE (1990)** Turgor-responsive gene transcription and RNA levels increase rapidly when pea shoots are wilted. Sequence and expression of three inducible genes. *Plant Mol Biol* 15:11-26 **Kammerloher W, Fischer U, Piechotka GP, Schaffner AR (1994)** Water channels in the plant plasma membrane cloned by immunoselection from a mammalian expression system. *Plant J* 6: 187-199.

**Kinoshita T, Hara-Nishimura I, Siraishi H, Okada K, Shimura Y, Nishimura M.(1994)** Nucleotide sequence of a transmembrane protein (TMP-C) cDNA in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*. 105 , 1441-1442 **Maurel C, Reizer J, Schroeder JI, Chrispeels MJ, Saier MHJr (1994)** Functional characterization of the *Escherichia coli* glycerol facilitator, GlpF, in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 269: 11869-11872

**Yamada S, Katsuhara M, Kelly WB, Michalowski CB, Bohnert HJ (1995)** A family of transcripts encoding water channel proteins: Tissue-specific expression in the common ice plant. *Plant Cell* 7: 1129-1142

**Yamaguchi-Shinozaki K, Koizumi M, Urao S, Shinozaki K (1992)** Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in *Arabidopsis thaliana*: Sequence analysis of one cDNA that encodes a putative transmembrane channel protein. *Plant Cell Physiol* 33: 217-224.

---



[Return to Plant Gene Register Index](#)

---

## CAPÍTULO 3

# CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *Pvlea-18* Y DE SU PRODUCTO DURANTE LA RESPUESTA AL DÉFICIT HÍDRICO Y DURANTE EL DESARROLLO DE PLÁNTULAS BIEN IRRIGADAS

### I. JUSTIFICACIÓN Y ANTECEDENTES

Hemos caracterizado la expresión de *Pvlea-18*, probablemente un nuevo representante de las familias de genes *lea*, de embriogénesis tardía, que responde a estrés osmótico en plantas (Cap. 2). A diferencia de los datos reportados para este tipo de genes, como es el caso del gen *PvleaIV-25* de frijol perteneciente a una familia conocida de genes *lea*, hemos encontrado que *Pvlea-18* se expresa durante el desarrollo normal de plántulas bien irrigadas de *Phaseolus vulgaris* (Cap. 2), y que lo hace en una zona específica: la región de elongación del hipocotilo. Como característica particular adicional también habíamos observado una reinducción temporal de su expresión durante la recuperación del crecimiento, verificado en plántulas sometidas a déficit hídrico después de que hubieron sido rehidratadas (Cap. 2). La expresión de este gen en la región de elongación de hipocotilos de frijol, donde se verifica un proceso de ajuste osmótico dirigido a estimular el proceso de expansión celular, así como en plántulas que verifican una activa recuperación del crecimiento, indica que la proteína PvLEA-18 podría jugar un papel en el proceso de generación de turgor celular, similar al de los osmolitos celulares, o que el gen *Pvlea-18* es sensible, a diferencia de otros genes *lea*, a la variación de potencial hídrico determinado por el ajuste osmótico en la zona de elongación celular. Esto supondría la participación de la proteína PvLEA-18 en procesos no descritos hasta la fecha para este tipo de proteínas.

### II. HIPÓTESIS

La acumulación del transcrito y de la proteína correspondientes al gen *Pvlea-18* se estimula por la disminución en los valores de potencial hídrico de los tejidos vegetales, ya sea por causa de un estrés osmótico medioambiental o por mecanismos de ajuste osmótico durante el desarrollo normal del organismo.

### III. OBJETIVOS

Mediante experimentos de tipo northern analizaremos la expresión del gen *Pvlea-18* durante el desarrollo de plántulas de frijol bien hidratadas o sometidas a déficit hídrico, y lo compararemos con los datos de la acumulación de la proteína PvLEA-18 en las mismas condiciones, obtenidos de experimentos tipo western y de su inmunolocalización en tejidos de frijol infiltrados con parafina.

### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 1. Purificación de la proteína PvLEA-18

Para disponer de anticuerpos dirigidos contra el producto del gen *Pvlea-18*, necesitábamos obtener la proteína PvLEA-18 pura. Para ello clonamos el ADNc correspondiente al gen *Pvlea-18* en un vector de expresión replicable en la bacteria *E. coli*, dado que dicho ADNc contiene el marco abierto de lectura completo de nuestro gen [Colmenero-Flores *et al.*, 1997]. Se empleó el vector pGEX-3, donde el gen clonado queda como fusión traduccional de un gen que codifica para la enzima glutatión transferasa (GST) [Ausubel *et al.*, 1994]. La sobreexpresión en *E. coli* del gen quimérico desde el promotor del gen de la  $\beta$ -galactosidasa, produce una sobreacumulación de la proteína híbrida GST-PvLEA-18 en la bacteria (Fig. 1, carriles 1-4). La proteína de fusión fue posteriormente purificada por cromatografía de afinidad a partir de una resina que contiene la molécula glutatión, sustrato de la enzima GST (Fig. 1, carriles 5-8).

#### 2. Síntesis y caracterización del anticuerpo anti-PvLEA-18

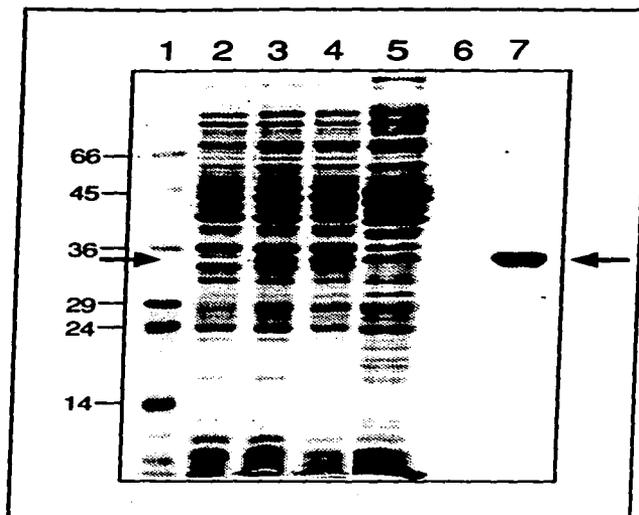
La proteína de fusión se inyectó en un conejo para inducir la síntesis de anticuerpos policlonales según los métodos convencionales descritos por Harlow y Lane (1988). A partir del suero sanguíneo obtenido del conejo, se purificó la fracción de IgG según se describe en la sección de materiales y métodos. Posteriormente, se purificaron por cromatografía de afinidad los anticuerpos que reconocen específicamente a la proteína de fusión GST-PvLEA-18 (ver materiales y métodos). El anticuerpo fue ensayado en un experimento tipo western a partir de extractos de proteínas obtenidos de raíces de plántulas sometidas a déficit hídrico y de plántulas control. Elegimos la raíz porque ya habíamos comprobado que se trata del órgano que acumula mayor cantidad de transcrito en plantas estresadas [Colmenero-Flores *et al.*, 1997]. El ensayo muestra el reconocimiento de un polipéptido de 14 KDa cuya acumulación se induce en condiciones de déficit hídrico (Fig. 2A).

anticuerpos levantados contra la región GST de la proteína de fusión, realizamos el mismo ensayo de competencia empleando diferentes concentraciones de la proteína GST. Esta proteína fue purificada a partir de una cepa de *E. coli* portadora del plásmido pGEX-3 en el que el gen *Pvlea-18* no había sido subclonado. Este ensayo se muestra en la Fig. 2C, donde se aprecia que el antígeno GST no bloquea el reconocimiento de la proteína de 14 KDa y sí lo hace la proteína de fusión GST-PvLEA-18, con lo que queda demostrado que la proteína de 14 KDa es reconocida específicamente por anticuerpos generados contra el antígeno PvLEA-18.

Dado que el peso molecular estimado del producto del clon de ADNc correspondiente al gen *Pvlea-18* es aproximadamente de 9 KDa, y la banda reconocida en tejidos de frijol migra como una proteína de 14 KDa en un gel SDS-PAGE, consideramos que debíamos demostrar que el gen *Pvlea-18* codifica para una proteína de un peso molecular aparente de 14 KDa. Para ello hicimos un ensayo tipo western a partir de una cepa de levadura que expresa el clon de ADNc correspondiente al gen *Pvlea-18* (Fig. 2D), y demostramos que su producto se desplaza en la posición correspondiente a 14 KDa. Esto puede deberse a una migración anómala, a modificaciones postraduccionales de la proteína en ambos organismos o a ambas razones.

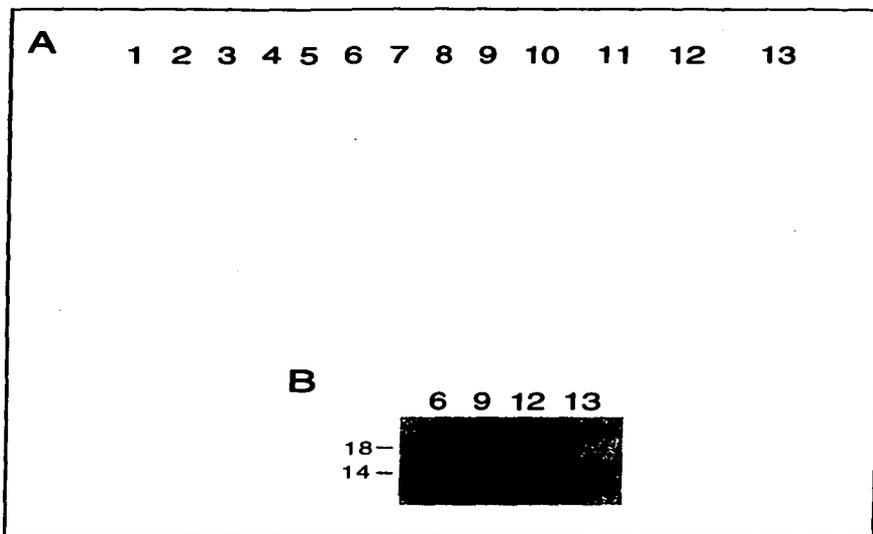
### **3. *Pvlea-18* es un gen de embriogénesis tardía cuyo transcrito se reinduce durante el desarrollo de la plántula**

En el capítulo 2, la acumulación de una gran cantidad del transcrito del gen *Pvlea-18* en la semilla seca del frijol, la rápida desaparición del transcrito del eje embrionario durante la germinación, la composición de aminoácidos deducida del gen y las características estructurales derivadas de la secuencia deducida de aminoácidos, nos permitió postular que se trata de un nuevo gen de embriogénesis tardía (*lea*), a pesar de que su secuencia no es homóloga a la de ninguna proteína o genes conocidos. Para confirmar inequívocamente si PvLEA-18 es una nueva proteína LEA, desarrollamos inicialmente dos líneas de aproximación experimental: i) comprobar si PvLEA-18 se acumula al final del desarrollo embrionario, periodo en el que la semilla adquiere tolerancia a la desecación y pierde un 90-95% de su contenido en agua; y ii) comprobar si el transcrito y la proteína desaparecen de los tejidos de la plántula durante y después de la germinación. Para abordar el primer punto, analizamos por un ensayo tipo western la presencia de PvLEA-18 durante la maduración del fruto del frijol (Fig. 3). Como se aprecia en dicha figura, la proteína PvLEA-18 sólo está presente en los frutos secos de frijol, por lo que se confirma que ésta se sintetiza durante la etapa tardía de la embriogénesis.



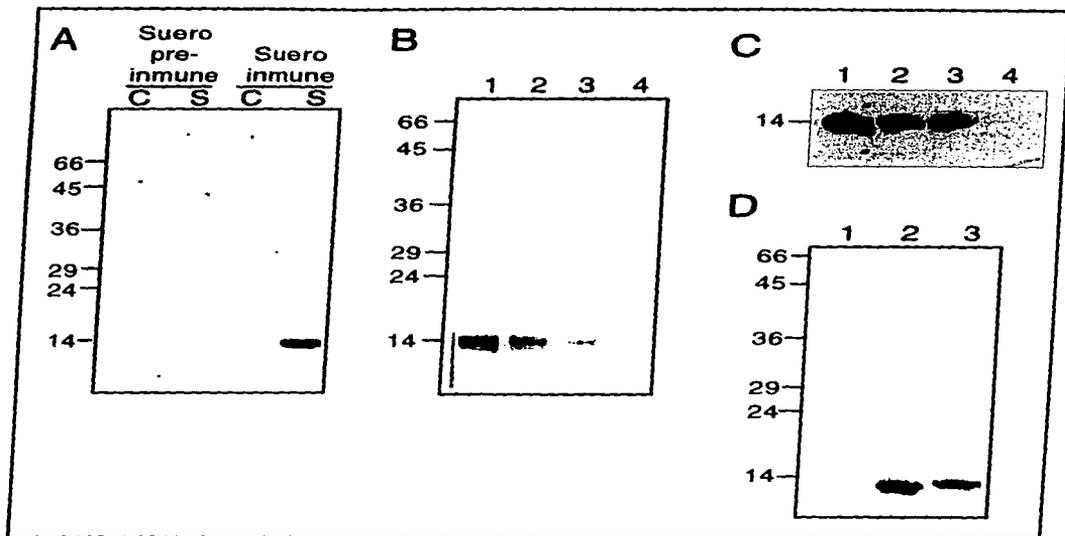
**Fig.1:** Purificación de PvLEA-18 como proteína de fusión GST-PvLEA-18 en *E. coli* transformada con el vector pGEX-3 en el que se ha subclonado el gen *Pvlea-18*. 1 Marcadores de peso molecular. 2 Extracto total de proteínas de *E. coli* transformada con el vector de expresión en ausencia del inductor IPTG. 3 *Idem*, tras 1 hora de inducción con IPTG. 4 *Idem*, tras 3 horas de inducción con IPTG. 5 extracto de proteínas del lisado de *E. coli* después del tratamiento de adsorción de GST-PvLEA-18 a la resina de agarosaglutinación. 6 Proteínas que quedan en el buffer de lavado tras el lavado de la resina de agarosaglutinación-GST-PvLEA-18. 7 Proteína GST-PvLEA-18 purificada tras la elución de la resina con glutatión reducido.

A través de un ensayo de competencia, donde el antisuero es bloqueado con diferentes cantidades de proteína GST-PvLEA-18 antes de usarlo en ensayos tipo western contra extractos totales de raíz de plántulas estresadas, pudimos comprobar que el polipéptido de 14 kDa era específicamente reconocido por los anticuerpos dirigidos contra la proteína de fusión (Fig. 2B). Para demostrar que la proteína de 14 kDa no está siendo reconocida por

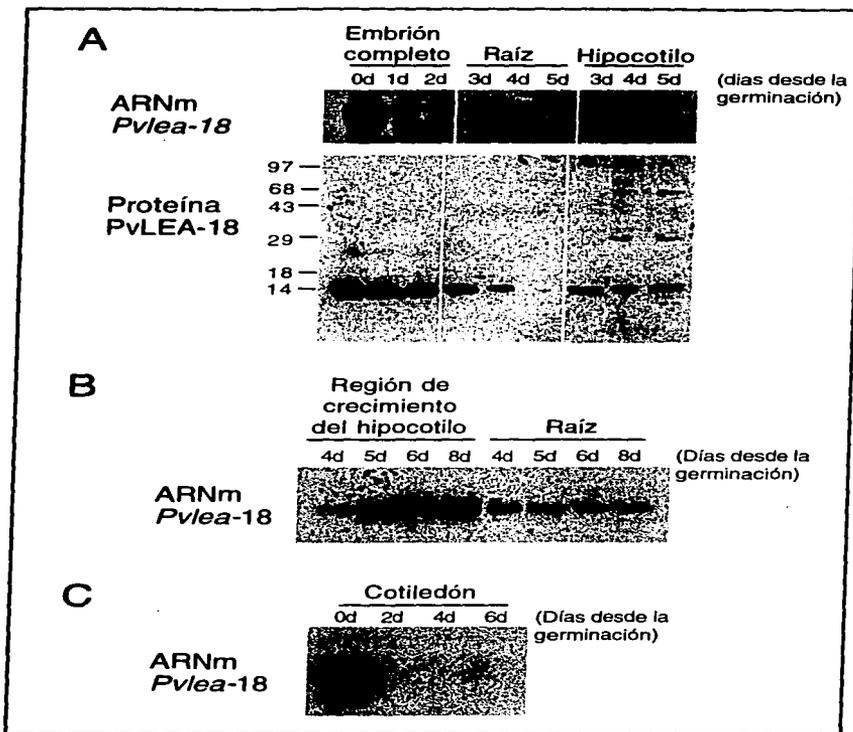


**Fig.3:** Acumulación de PvLEA-18 en el periodo final de la embriogénesis. (A) Aspecto de los frutos de *Phaseolus vulgaris* durante su maduración, desde que el ovario acaba de ser fecundado en la flor (1 y 2) hasta que el fruto ha completado su maduración y sus tejidos se han deshidratado (13). (B) Western blot de extractos de proteínas obtenidos de algunos de los frutos mostrados en la imagen (A). El número presente en cada carril corresponde a la numeración de la figura (A) y al estado de maduración del fruto ensayado.

Para cumplir con el segundo objetivo, y para avanzar en la caracterización de la expresión del gen *Pvlea-18* en plántulas control (según comprobamos en el Capítulo 2), estudiamos el comportamiento de su transcrito y su producto durante la germinación y el establecimiento de la plántula mediante experimentos tipo northern y western respectivamente. Para ello usamos tejidos obtenidos del eje embrionario seco, de la germínula y de diferentes órganos de la plántula durante su desarrollo (Fig. 4). En la Figura 4A observamos que el transcrito de dicho gen desaparece completamente del eje embrionario durante las primeras 48h de desarrollo, como ya habíamos comprobado previamente [Colmenero-Flores *et al.*, 1997]. Sin embargo, la proteína disminuye muy ligeramente su presencia en dichos tejidos y permane-



**Fig. 2:** Caracterización del anticuerpo anti-PvLEA-18. (A) Ensayos tipo western realizados con el suero inmune o el preinmune, a partir de extractos de proteínas de raíces obtenidas de plántulas bien irrigadas (C) o de plántulas sometidas a déficit hídrico (S). (B) Ensayo de competencia contra el antígeno GST-PvLEA-18. Se realiza un experimento tipo western con extractos de raíz de plántulas estresadas a partir de antisuero preincubado con diferentes concentraciones de la proteína de fusión GST-PvLEA-18: 0 ng en el carril 1; 50 ng en el carril 2; 500 ng en el carril 3; y 5  $\mu$ g en el carril 4. (C) Ensayo de competencia contra el antígeno GST. Se procede de la misma forma que en la Figura (B), pero ahora empleamos como antígeno diferentes concentraciones de la proteína GST: 0  $\mu$ g en el carril 1; 5  $\mu$ g en el carril 2; y 50  $\mu$ g en el carril 3. Como control, en el carril 4 se muestra el resultado del ensayo tipo western cuando se usa un anticuerpo preincubado con 5  $\mu$ g de la proteína de fusión GST-PvLEA-18. (D) Ensayo tipo western donde se reconoce al producto del gen *Pvlea-18* sintetizado en *Saccharomyces cerevisiae*. El carril 1 corresponde a un extracto de una cepa de levadura transformada con el vector pRS699; el carril 2 corresponde a un extracto de levadura transformada con el mismo vector donde se ha subclonado el gen *Pvlea-18*; y el carril 3 corresponde a un extracto de semilla seca de frijol.

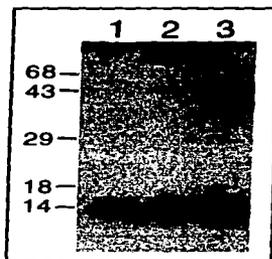


**Fig.4:** Comportamiento del transcrito y de la proteína del gen *Pvlea-18* durante la germinación y el establecimiento de la plántula. (A) Ejes embrionarios de semillas secas (0d); plántulas completas de uno (1d) o dos días (2d) de edad; y las raíces e hipocotilos de plántulas de tres (3d), cuatro (4d) y cinco (5d) días de edad se usaron para extraer ARN total y proteína. El material se empleó respectivamente en un ensayo tipo northern a partir de la sonda correspondiente al ADNc del gen *Pvlea-18* y en un ensayo tipo western con el antisuero anti-PvLEA-18. (B) Comportamiento del transcrito del gen *Pvlea-18* durante el desarrollo posterior de la plántula. Se extrajo ARN total de la región de crecimiento y de la raíz de hipocotilos de frijol a diferentes días de desarrollo y se empleó en experimentos tipo northern. (C) Estudio, mediante ensayo tipo northern, del transcrito del gen *Pvlea-18* en cotiledones durante el crecimiento de la plántula.

ce muy acumulada en el eje embrionario a las 48 horas de desarrollo. Después de la desaparición del transcrito, el gen se vuelve a inducir, primero en la radícula, coincidiendo con su desarrollo más precoz, y posteriormente en el hipocotilo, también coincidiendo con el inicio de su elongación, que se efectúa con retraso en comparación con la raíz. La reinducción del gen en la raíz es transitoria, por lo que después de una máxima acumulación del transcrito al tercer día, éste disminuye progresivamente, siendo imperceptible el quinto día de desarrollo. Extrañamente, no se aprecia una reacumulación de la proteína en radículas de tres días, a pesar de la elevada acumulación de su mensajero. Posteriormente, y en concordancia con la disminución del transcrito, la proteína acaba por ser indetectable en raíces de plántulas de cinco días (Fig. 4A). En el hipocotilo, a pesar de no haber ARNm de *Pvlea-18* en plántulas de tres días, la proteína no desaparece. La reinducción del gen en este órgano comienza a observarse en plántulas de cuatro días, aumentando posteriormente (Fig. 4A). Se puede apreciar un comportamiento diferencial en la relación ARNm/proteína entre la raíz y el hipocotilo. Esto podría ser consecuencia de un proceso de regulación postranscripcional que determina una menor acumulación de proteína en la raíz y que describiremos más adelante. Por los datos que presentamos en el Capítulo 2 y que confirmaremos más adelante, sabemos que la reinducción del gen *Pvlea-18* en el hipocotilo durante el desarrollo de plántulas bien hidratadas ocurre específicamente en la región de crecimiento de dicho órgano. Para ver si dicha reinducción también es transitoria, como en la raíz, analizamos la presencia del transcrito del gen *Pvlea-18* en la región de crecimiento del hipocotilo y en raíces de plántulas bien hidratadas a lo largo de un espacio de tiempo más prolongado (Fig. 4B). Pudimos comprobar que el transcrito se acumula progresivamente en la región de crecimiento del hipocotilo durante el desarrollo de la plántula, y que no se vuelve a observar una reinducción de la expresión de *Pvlea-18* en la raíz. A diferencia del comportamiento de *Pvlea-18* en la raíz y en el hipocotilo, en los cotiledones no se reinduce la expresión del gen durante el desarrollo de la plántula (Fig. 4C). Como era de esperar de un gen *lea*, el transcrito de *Pvlea-18* desaparece del eje embrionario y de los cotiledones durante la germinación y el inicio del establecimiento de la plántula. Así mismo, disminuye drásticamente la presencia de la proteína. Sin embargo, el gen se reinduce transitoriamente en la radícula emergente y, posteriormente, en la región de crecimiento del hipocotilo, donde el transcrito y la proteína (ver adelante) permanecieran acumulados durante el posterior desarrollo de la plántula.

**4. PvLEA-18 es una proteína termoestable que se acumula abundantemente en los tejidos vegetales**

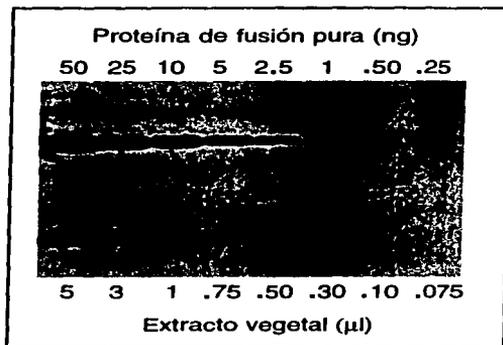
Las proteínas LEA hidrofílicas se caracterizan entre otras cosas por mantenerse solubles en un buffer salino después de calentar un extracto vegetal a temperaturas cercanas a los 100°C [Dure III, 1993]. También se ha comprobado que son proteínas muy abundantes en las semillas secas, donde la presencia del conjunto de los miembros de diversas familias de proteínas LEA se ha estimado en torno al 0.3 mM [Dure III, 1993]. Siguiendo con la caracterización de la proteína PvLEA-18 desde la perspectiva de que se trata de una nueva proteína LEA de plantas, decidimos determinar si, como esperamos de una proteína muy hidrofílica, probablemente no globular, ésta proteína permanece soluble tras un tratamiento de calor. Una proteína no termoestable permanece soluble al hervir en presencia del detergente, pero se coagula y precipita durante la centrifugación después de un tratamiento de calor en ausencia del detergente. Para determinar la resistencia frente a la coagulación de PvLEA-18 tras un tratamiento de calor, hervimos tres extractos iguales de proteínas solubles de semilla seca en ausencia o en presencia de un detergente (SDS) y centrifugamos posteriormente dichos extractos (Fig. 5). La presencia de cantidades similares de proteína después de hervir y centrifugar los extractos en presencia o ausencia de SDS, confirma que PvLEA-18 es termoestable.



**Fig.5:** Ensayo de termoestabilidad de PvLEA-18. Tres extractos idénticos de proteína soluble de semilla seca *Phaseolus vulgaris*, resuspendidos en buffer PBS e inhibidores de proteasas, se llevaron a una concentración final de 5% de SDS (1), 1.5% de SDS (2) y sin SDS (3) previamente a un tratamiento de hervor de 10 mnt y de centrifugación (14.000 g) de 15 mnt. Cada sobrenadante se empleó en un ensayo tipo western con el antisuero anti-PvLEA-18

Para determinar la abundancia de PvLEA-18 en los tejidos vegetales, empleamos ejes embrionarios de 36h de desarrollo (36h después del inicio de la hidratación de las semillas), en los que la cantidad de proteína total es similar a la de tejidos vegetativos estresados durante 24h según datos de inmunolocalización. La estimación se realizó a partir de la proteína de fusión purificada, que se usó como patrón en un ensayo tipo western en el que se

comparan cantidades conocidas de la proteína GST-PvLEA-18 con diferentes cantidades del extracto vegetal (Fig. 6). Un análisis densitométrico de las señales correspondientes a la banda de 14 KDa comparado con la curva estándar obtenida de los valores de las bandas del patrón GST-PvLEA-18, indicó que hay 3ng de PvLEA-18/ $\mu$ l de extracto. Considerando el contenido de agua del material fresco, la concentración de buffer en el extracto de proteínas liofilizado y el peso molecular de PvLEA-18, pudimos estimar que la concentración de PvLEA-18 en embriones de 36h de desarrollo es de 0.51  $\mu$ M (consultar materiales y métodos para los detalles del cálculo).

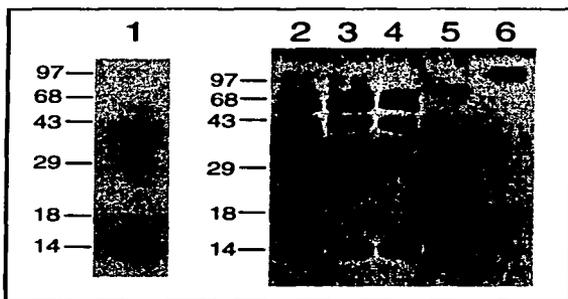


**Fig.6:** Cuantificación por western blot de la abundancia de PvLEA-18 en un tejido vegetal. Cantidades conocidas de la proteína de fusión se corrieron en SDS-PAGE junto con diferentes volúmenes de un extracto vegetal obtenido de embriones de 36h de desarrollo, que fue liofilizado y resuspendido en buffer de carga. Se realizó un ensayo tipo western a partir de dicho gel de acrilamida usando el anticuerpo anti-PvLEA-18. Con los valores relativos de la señal de las bandas de la proteína de fusión, obtenidos por densitometría, se realizó una curva estándar que, con los valores de las bandas de 14 KDa del extracto vegetal, permitió determinar la cantidad de proteína PvLEA-18 por unidad de volumen del extracto vegetal.

La concentración de PvLEA-18 sería mucho mayor en embriones secos, donde hay más cantidad de proteína y mucho menor contenido de agua. Estimando un 5% de contenido en agua y 2-3 veces mayor cantidad de proteína (Fig. 4A), la concentración de PvLEA-18 pasaría a ser en torno a 15  $\mu$ M. Esta concentración, si bien es 20 veces menor que la cantidad estimada para el conjunto de los componentes algunas familia de proteínas LEA, sigue siendo abundante para una sola proteína. En ciertos tejidos vegetativos sometidos a déficit hídrico, la cantidad de proteína es similar a la de embriones de 36h (ver más adelante), pudiendo ser la concentración de PvLEA-18 mucho mayor en el núcleo de las células donde PvLEA-18 se acumula y en las vesículas del xilema a juzgar por la señal de inmunolocalización de la proteína (ver más adelante).

## 5. PvLEA-18 pertenece a una familia de proteínas conservadas entre especies de plantas distantes

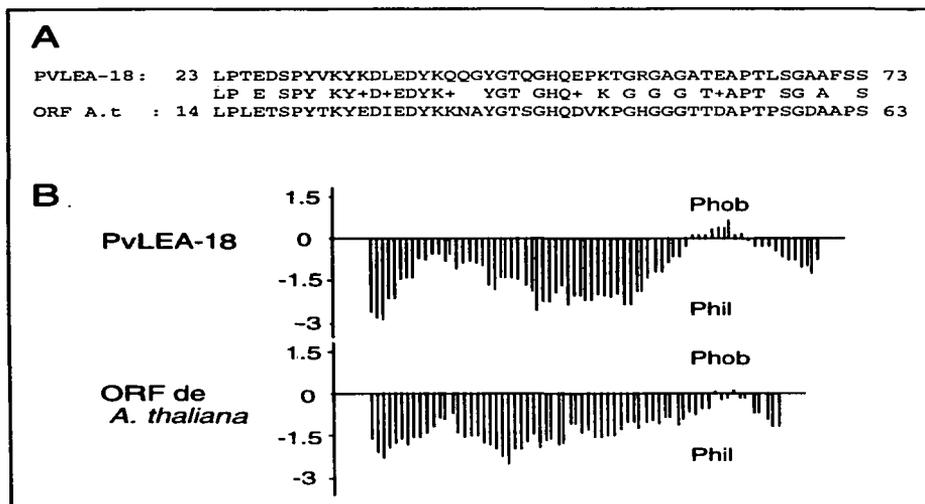
Siendo una proteína nueva, sin homología con ninguna otra caracterizada hasta la fecha, nos preguntamos si forma parte de una familia de proteínas con representantes en otras especies vegetales. Con vistas a futuro, nos interesa determinar grado de conservación que mantiene PvLEA-18 con sus homólogos en otras especies, lo que determina el grado de restricciones evolutivas impuesto a esta proteína, aproximándonos a nociones como la conservación de una función celular importante y/o la necesidad de mantener su capacidad de interacción con otro tipo de moléculas. Hemos empezado por buscar proteínas reconocibles por el anticuerpo anti-PvLEA-18 en otras variedades de *Phaseolus vulgaris* diferentes a Negro Jamapa, en otras dicotiledóneas y en maíz, una planta monocotiledónea (Fig. 7). Encontramos que en todas las plantas existen proteínas relacionadas a PvLEA-18. En otras varie-



**Fig.7:** Búsqueda de proteínas relacionadas con PvLEA-18 en otras variedades y especies vegetales. Obtuvimos extractos de proteínas totales de semillas secas de otras plantas: *P. vulgaris*, var. Negro Jamapa (1); *P. vulgaris*, var. Michoacán (2); *P. vulgaris*, var. Cacahuete (3); *P. vulgaris*, var. Flor de Mayo (4); *A. thaliana* (5); y maíz (7). Dichos extractos se usaron en un experimento tipo western con el anticuerpo anti-PvLEA-18.

dades de frijol encontramos la banda de 14 KDa, pero también otras de alto peso molecular. La presencia de las bandas de alto peso molecular puede estar

relacionada con la capacidad de PvLEA-18 de formar agregados estables, fenómeno que hemos podido observar en diversos tipos de tejidos de la variedad Negro Jamapa en determinadas condiciones de extracción. Las proteínas de *A. thaliana* y de maíz relacionadas a PvLEA-18 también son de muy alto peso molecular. Sabemos que en maíz la proteína de alto peso molecular desaparece durante la germinación, y que en germinulas sometidas a estrés osmótico se induce la acumulación de un polipéptido de 14 KDa reconocible por el anticuerpo anti-PvLEA-18 (J. Vázquez, comunicación personal). También hemos usado el programa "T-BLAST" para localizar en las secuencias de nucleótidos depositadas en los bancos de datos marcos abiertos de lectura con secuencia de aminoácidos homóloga a la de PvLEA-18. Pudimos detectar un fragmento de ADN genómico de *A. thaliana* cuya secuencia deducida de aminoácidos posee un 60% de identidad y un 70% de similitud con PvLEA-18 (Fig. 8A). Además, el perfil hidropático deducido del putativo polipéptido de *A. thaliana* es muy parecido al de PvLEA-18 (Fig. 8B)



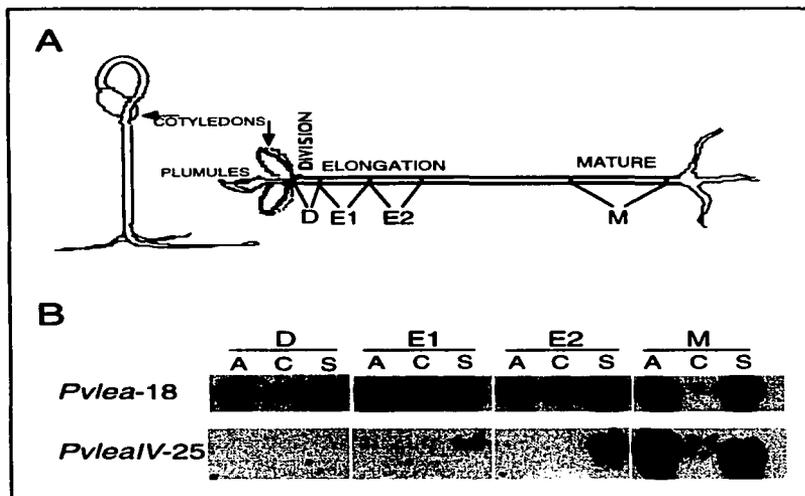
**Fig.8:** Homología de PvLEA-18 con la posible proteína de *A. thaliana*. (A) Comparación de la secuencia de aminoácidos de ambas proteínas. (B) Comparación de los respectivos perfiles hidropáticos deducidos de sendas secuencias de aminoácidos.

Recientemente hemos confirmado la presencia de proteínas relacionadas a PvLEA-18 en otras especies vegetales (datos no mostrados), entre las que se incluye *Selaginella lepidophylla*, una especie perteneciente a la división de las Licofitas, que actualmente son un residuo evolutivo de un grupo de plantas muy representativas del periodo Carbonífero (hace 248 millones de años). Todos estos datos demuestran que PvLEA-18 pertenece a una familia de proteínas altamente conservada en una amplia variedad de especies vegetales distanciadas filogenéticamente.

## **6. La expresión de *Pvlea-18* en la región de elongación no es común entre los genes *lea*.**

Característicamente, los genes *lea* están presentes en tejidos vegetativos únicamente en condiciones de estrés osmótico. Pero *Pvlea-18* se reinduce en diversos órganos durante el desarrollo de plántulas bien irrigadas y mantiene un significativo nivel de expresión en la región de crecimiento del hipocotilo. Esto resulta inesperado para un gen asociado a la respuesta a estrés y que está regulado por ácido abscísico (ABA). En un reporte reciente se ha analizado la expresión de un gen *lea* perteneciente al grupo de las dehidrinas (grupo 2) en las regiones de desarrollo de hipocotilos de soja, comprobándose que la presencia del transcrito es totalmente dependiente del déficit hídrico tanto en la región madura como en la de crecimiento [Whitsitt et al., 1997]. Para profundizar más en este fenómeno, decidimos comparar la expresión de *Pvlea-18* con la de otro gen *lea* de *P. vulgaris*, y analizar la sensibilidad de estos genes a ABA en las regiones de crecimiento del hipocotilo. En la Figura 9A describimos las regiones de desarrollo del hipocotilo de frijol que van a ser empleadas en este estudio. Junto con *Pvlea-18*, analizamos la expresión de *PvleaIV-25* [Colmenero-Flores et al., 1997], un gen perteneciente a una familia *lea* conocida, la familia D-113 o grupo 4 (ver Cap. 1). Hicimos experimentos tipo northern a partir de plántulas bien irrigadas, plántulas sometidas a déficit hídrico y plántulas tratadas con ABA (Fig. 9B). Podemos observar que ambos genes responden a tratamientos de déficit hídrico y de ABA, pero sólo el transcrito de *Pvlea-18* está presente en tejidos control. La máxima acumulación de *Pvlea-18* en hipocotilos de plántulas bien hidratadas se produce en la región de máxima elongación, disminuyendo en las regiones contiguas (la región de división y la región E2) y siendo imperceptible en la región madura, lo que confirma los resultados descritos en el Capítulo 2. También observamos que *Pvlea-18* sigue siendo sensible a ABA en las regiones de crecimiento del hipocotilo, aunque estimamos poco probable que dicha hormona medie su expresión en la región de elongación de plántulas bien hidratadas. Probablemente el promotor del gen *Pvlea-18* posee elementos de control regulables por estímulos que clásicamente se han considerado de acción

opuesta: los relacionados con la respuesta a estrés y los relacionados con el crecimiento. Así, *Pvlea-18* parece tener un comportamiento único entre los genes *lea*, y su expresión debe estar regulada por una diversidad de factores, de los que sólo conocemos, a algunos protagonistas.

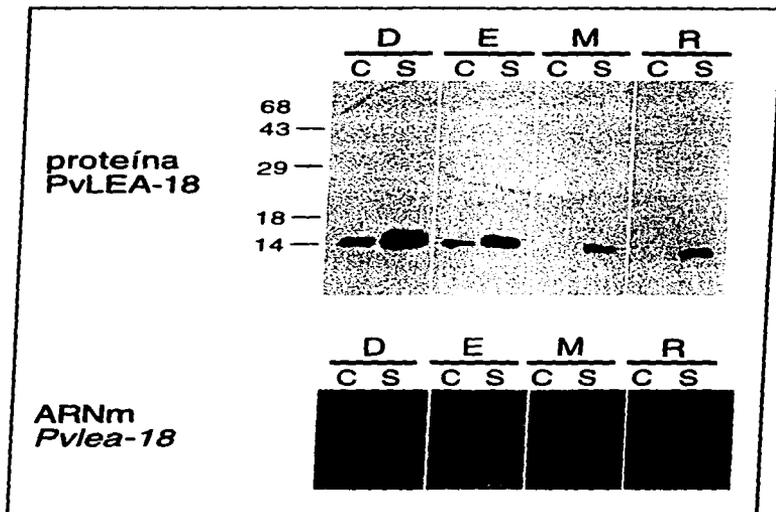


**Fig.9:** Expresión de *Pvlea-18* en las regiones de desarrollo del hipocotilo de *P.vulgaris*. **(A)** Descripción de las diferentes regiones de desarrollo del hipocotilo. **(B)** Expresión de *Pvlea-18* y de *PvleaIV-25* en las regiones de desarrollo de hipocotilos de plántulas tratadas con ABA (A), sometidas a déficit hídrico (S), o bien irrigadas (C). Se realizaron experimentos tipo northern a partir de ARN total obtenido de las diferentes regiones descritas y se usaron como sondas los fragmentos de ADNc correspondientes a cada gen.

## 7. La proteína PvLEA-18 se acumula preferencialmente en las regiones más apicales del hipocotilo

Para estudiar el comportamiento de la proteína *Pvlea-18* en las regiones de desarrollo del hipocotilo y en la raíz de plántulas control y estresadas, disectamos dichas regiones y las empleamos para obtener proteína total.

Usamos la fracción resistente a hervor de dichos extractos para realizar el ensayo tipo western. También se extrajo ARN total de cada región para comparar exactamente la cantidad de proteína respecto al transcrito (Fig.10):



**Fig.10:** Acumulación de PvLEA-18 en las regiones de desarrollo del hypocotilo: región de división (D); región de elongación, E1+E2 (E); y región madura (M). También se usó la raíz (R) de plántulas de *P. vulgaris*. Dichas regiones se disecaron a partir de plántulas de control (C) y estresadas (S), se emplearon para extraer proteína total y se obtuvieron las fracciones resistentes a hervor para usarlas en un ensayo tipo western con el anticuerpo anti-PvLEA-18. También se extrajo ARN total de cada zona para realizar un experimento tipo northern con una sonda obtenida del ADNc del gen *Pvlea-18*.

Se aprecia claramente que el déficit hídrico induce la acumulación de la proteína PvLEA-18 en todas las zonas analizadas de la plántula. Sin embargo, si observamos la distribución de PvLEA-18 en condiciones control, no encontramos una mayor acumulación de la proteína en la región de elongación, a pesar de ser la zona de máxima acumulación de transcrito. La mayor

acumulación de PvLEA-18 ocurre en la zona apical o región de división del hipocotilo. En las plántulas estresadas volvemos a encontrar otro desajuste en la relación ARNm/proteína cuando comparamos las diferentes regiones analizadas. Esta vez, a pesar de ser la raíz y la región madura del hipocotilo las zonas con mayor acumulación de transcrito, la mayor acumulación de proteína vuelve a verificarse en la región de división. A pesar de que existe una clara relación entre la inducción del gen *Pvlea-18* y el grado de acumulación de su producto, existe otra componente que determina una mayor acumulación de la proteína PvLEA-18 en las regiones apicales del hipocotilo. Estos datos sugieren la existencia de un mecanismo de regulación postranscripcional que opera diferencialmente en las distintas regiones de desarrollo del hipocotilo.

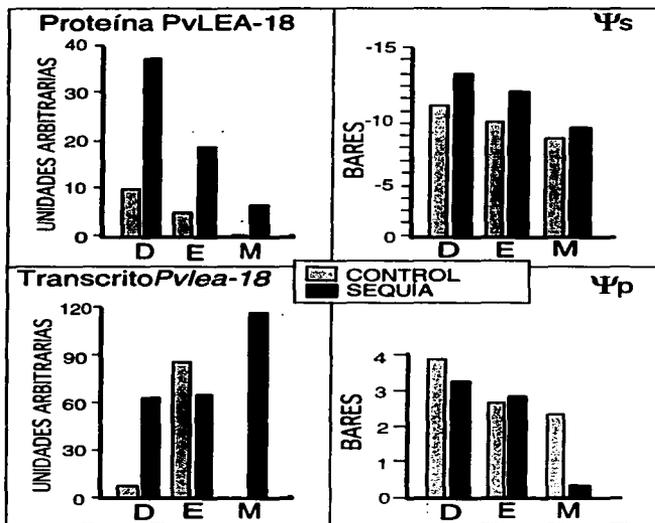
### **9. La acumulación de la proteína PvLEA-18 es proporcional a la concentración de osmolitos en los tejidos vegetales.**

Pretendemos determinar qué factor es el responsable de la acumulación preferencial de la proteína en la región apical del hipocotilo. Dado que dicha proteína está relacionada funcionalmente con condiciones de baja disponibilidad de agua, decidimos determinar el estatus hídrico de las diferentes regiones de desarrollo del hipocotilo de plántulas de frijol. La variación de la disponibilidad de agua en diferentes regiones de un mismo órgano vegetal no es una idea nueva, y es un fenómeno del que hemos hablado en el Capítulo 1 en relación a: i) la necesidad de captar agua que poseen las células en activa elongación para generar la fuerza de turgor que les permite expandirse, y ii) la necesidad de generar un gradiente de potencial hídrico que permita el ascenso de agua desde las raíces hacia la región apical de una plántula en contra de la fuerza de gravedad (recordemos que por carecer de hojas, las plántulas no pierden tan activamente agua por evapotranspiración en la región aérea, que es lo que genera el fuerte gradiente de agua en las plantas adultas). Es más, en plántulas de soya, un sistema muy similar al del frijol, se ha medido un gradiente de potencial hídrico que es más negativo en la región apical del hipocotilo y aumenta hacia la región basal [Nonami y Boyer, 1993]. El estatus hídrico de las regiones de desarrollo del hipocotilo se determinó en el Capítulo 2 a través de la medición de los valores de potencial hídrico y potencial osmótico en cada zona del hipocotilo de plántulas bien hidratadas y plántulas sometidas a déficit hídrico. Reproducimos dichos valores en la Tabla 1. Podemos comprobar que las plántulas estresadas poseen potenciales hídricos más negativos en todas las regiones analizadas, pero tanto en hipocotilos de plántulas control como de plántulas sometidas a déficit hídrico, se produce un gradiente de potencial hídrico que es más negativo en la región apical. Las diferencias en los valores de potencial hídrico se deben a las variaciones en el potencial osmótico, que es una medida de la acumulación de osmolitos en los te-

**Tabla 1.** Estatus hídrico de las regiones de desarrollo del hipocotilo

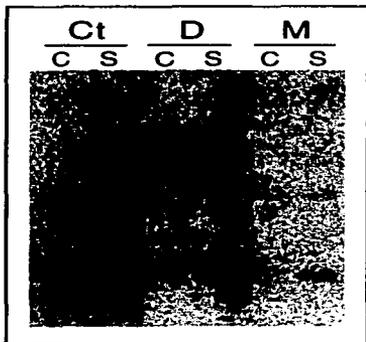
Regiones de desarrollo del hipocotilo	Potencial hídrico ( $\Psi_w$ )		Potencial osmótico ( $\Psi_s$ )		Turgor ( $\Psi_p$ )	
	C	S	C	S	C	S
División:	-7.03 ( $\pm$ 1.02)	-9.83 ( $\pm$ 0.70)	-10.96 ( $\pm$ 1.35)	-13.05 ( $\pm$ 1.55)	3.85	3.22
Elongación:	-6.50 ( $\pm$ 0.74)	-8.94 ( $\pm$ 1.04)	-9.20 ( $\pm$ 0.96)	-11.93 ( $\pm$ 1.78)	2.70	2.80
Madura:	-5.88 ( $\pm$ 1.14)	-8.51 ( $\pm$ 1.31)	-8.24 ( $\pm$ 0.85)	-8.82 ( $\pm$ 1.16)	2.36	0.31

Entre paréntesis indicamos las desviaciones estándar de cada valor de un total de 30 mediciones independientes. Se emplearon plántulas bien hidratadas (C) y sometidas a déficit hídrico (S).



**Fig. 11 :** Comparación de los valores de acumulación del mensajero y del producto del gen *Pvlea-18* con los valores del potencial osmótico y de turgor en las regiones de desarrollo de plántulas de *P. vulgaris* bien hidratadas o sometidas a déficit hídrico. Los valores del transcrito y la proteína se obtuvieron por densitometría a partir de las bandas obtenidas de los experimentos tipo northern y western presentes en la Fig. 10.

cidos vegetales (ver Cap. 1). Para correlacionar la diversidad de parámetros que estamos manejando, la acumulación del transcrito de *Pvlea-18* con la de su producto PvLEA-18 y con los valores del estatus hídrico en cada zona de desarrollo del hipocotilo de plántulas bien hidratadas y sometidas a déficit hídrico, representamos esos valores en diversas gráficas (Fig. 11). Pudimos observar que la acumulación de la proteína PvLEA-18 correlaciona bien con los valores de potencial osmótico en las regiones del hipocotilo, tanto en plántulas control como estresadas. También encontramos correlación entre la fuerte pérdida de turgor en la región madura del hipocotilo de plántulas estresadas con una mayor inducción del transcrito en esa zona. Esta correlación también fue establecida para la mayoría de los genes de respuesta a estrés que hemos caracterizado en esta tesis (ver Cap. 2). Pero la relación entre la presencia de osmolitos y la acumulación de la proteína pvLEA-18 puede ser algo muy indirecto. Es posible que esté relacionado con otros parámetros propios de células proliferativas. Para distinguir entre ambos factores, potencial osmótico y crecimiento, decidimos analizar la acumulación de proteína en el cotiledón (Fig. 12), que no es un tejido proliferativo pero posee una acumulación de osmolitos aun mayor que la región de división (dato no mostrado).



**Fig.12:** Acumulación de PvLEA-18 en el cotiledón de plántulas bien hidratadas (C) y plántulas sometidas a déficit hídrico (S). Se disectaron diferentes zonas de dichas plántulas: los cotiledones (Ct) y la región de división (D) y madura (M) del hipocotilo. Se obtuvo la proteína total de cada zona y de los extractos del hipocotilo se usaron las fracciones resistentes a hervor. Los diferentes extractos se usaron en un ensayo tipo western con el anticuerpo anti-PvLEA-18.

Esta figura indica que la cantidad de proteína PvLEA-18 correlaciona mejor con la acumulación de osmolitos que con el crecimiento. Pero también muestra otro dato muy interesante. Si volvemos a la Figura 4C, recordaremos que el transcrito del gen *Pvlea-18* había desaparecido del cotiledón a las 48h

del inicio de la germinación, y que no vuelve a inducirse más en cotiledones de plántulas bien irrigadas. Sin embargo, la proteína permanece acumulada en dicho órgano después de varios días sin transcrito, lo que indica que no se degrada. Esto nos permite postular que el mecanismo de regulación postranscripcional que opera diferencialmente en distintas regiones de la plántula afecta a la estabilidad de la proteína, y hace a PvLEA-18 más estable en tejidos donde se acumulan mayores concentraciones de osmolitos.

#### **10. PvLEA-18 se acumula en el núcleo y el citoplasma de una amplia variedad de tipos celulares.**

Para estudiar la distribución de PvLEA-18 en los tejidos de las diferentes zonas de desarrollo del hipocotilo y en la raíz, hicimos experimentos de inmunolocalización usando plántulas bien hidratadas y sometidas a déficit hídrico. En la Figura 13 (imágenes ampliadas x10) y la Figura 14 (imágenes ampliadas x15) se observa la distribución de PvLEA-18 a lo largo de las diferentes regiones del hipocotilo. Lo primero que llama la atención es la mayor acumulación de PvLEA-18 en los tejidos de las plántulas sometidas a déficit hídrico. También es notoria la mayor distribución y acumulación de proteína en los tejidos en crecimiento de las plántulas estresadas (Fig. 13 y 14, B y E) comparados con el tejido de la región madura (Fig. 13 y 14, H). Esta distribución diferencial de proteína se alcanza a apreciar también en las secciones obtenidas de plántulas control en las Figuras 13 y 14 (secciones A,D,G). La proteína se aprecia uniformemente distribuida en todos los tipos celulares de la región de división del hipocotilo de plántulas estresadas (Fig. 13 y 14, B), pero a medida que nos aproximamos a la región madura, se aprecia una disminución de PvLEA-18 en las células parenquimáticas del córtex y la médula (Fig. 13 y 14, H). Así, en la región madura la proteína queda restringida fundamentalmente al tejido vascular y a la epidermis. Aunque la cantidad de proteína es mucho menor en las secciones de plántulas control, su distribución es similar a la de las plántulas estresadas (Figs. 13 y 14, A,D,G). Estos datos confirman los resultados obtenidos mediante experimentos tipo western. La mayor acumulación de PvLEA-18 en la epidermis y las capas más periféricas del córtex puede deberse a una mayor pérdida de agua en dichos tipos celulares por su exposición al medioambiente. De hecho se estima que entre el 5-10% de la evapotranspiración en las plantas adultas ocurre directamente a través de la epidermis [Levitt, 1980]. Otro tejido de alta acumulación de proteína es el vascular, en el que se conduce la savia de la planta, que posee una muy elevada acumulación de solutos que podría atrapar agua de las células que rodean a los vasos conductores.

En la Figura 14, se aprecia que PvLEA-18 se acumula en los núcleos de las células. Este fenómeno se aprecia claramente en una aproximación 100x que

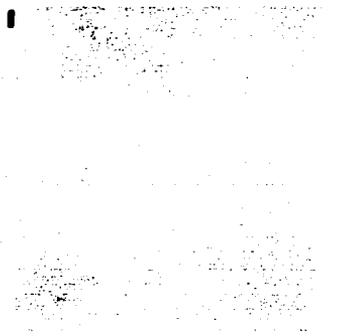
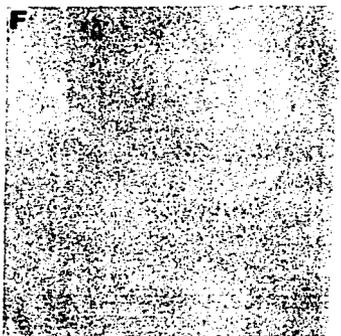
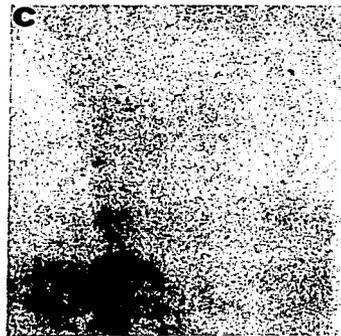
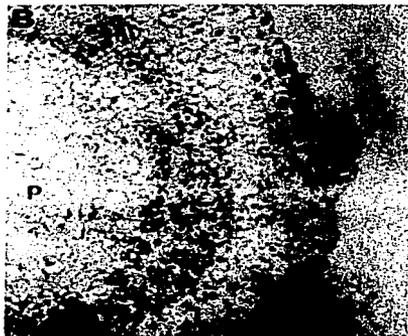
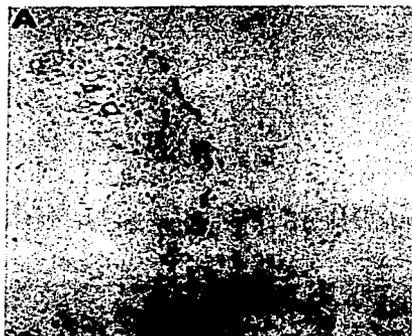
presentamos en la Figura 15, en la que se muestran células de la epidermis y del córtex de la región de elongación del hipocotilo de plántulas estresadas. La secuencia de aminoácidos de PvLEA-18 no presenta regiones conservadas conocidas de traslocación al núcleo, aunque esto también ocurre con otras proteínas nucleares de plantas.

La radícula y el hipocotilo de embriones emergentes de 36h de desarrollo muestra una presencia abundante y una distribución homogénea de PvLEA-18 en todos los tipos celulares (Fig. 16).

Es destacable la abundante acumulación de PvLEA-18 en las vesículas en diferenciación y diferenciadas del xilema en diferentes órganos de la plántula (Fig. 17). A pesar de que este tipo de células acaba por morir precozmente durante su desarrollo después de sintetizar una gruesa pared celular, en las plántulas permanecen aún vivas muchas de ellas, incluso en la región madura. En la vesícula diferenciada de xilema de la sección 17E, se puede apreciar el núcleo celular, lo que muestra que la célula aún sigue viva. La abundante acumulación de PvLEA-18 en las vesículas del xilema puede deberse al fenómeno mencionado de la gran concentración de osmolitos que la savia transportada en estas células.

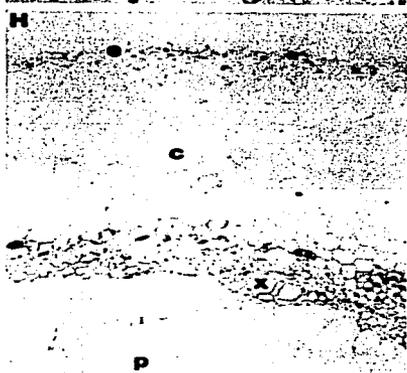
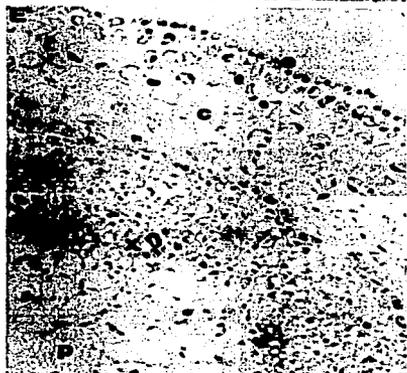
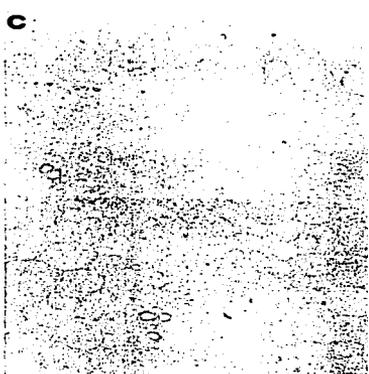
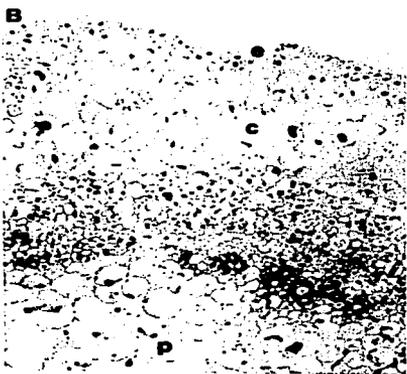
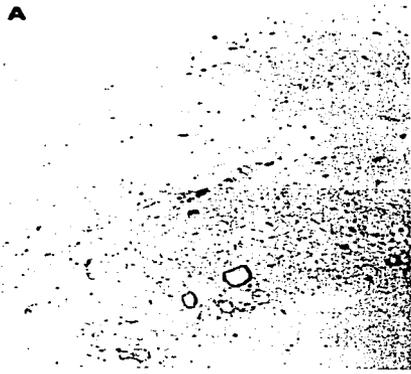
Otro tejido que acumula abundantemente la proteína PvLEA-18 es el meristemo radicular (Fig. 18 y Fig 16A). Es interesante observar que, de forma similar a lo que ocurre en las regiones de desarrollo del hipocotilo, en la raíz lateral se verifica una mayor acumulación de proteína en la región apical (meristemo radicular), que va disminuyendo cuando nos aproximamos a zonas más basales (Fig. 18B yC).

**Fig. 13:** Distribución de PvLEA-18 en los tejidos de las regiones de desarrollo del hipocotilo de plántulas control y plántulas sometidas a déficit hídrico de 6d de desarrollo. Diferentes regiones de las plántulas fueron disectadas y embebidas en parafina. Se obtuvieron rodajas de 7µm con el microtomo y se fijaron sobre portaobjetos. Tras un tratamiento de desparafinación, las muestras fueron tratadas alternativamente con anticuerpo anti-PvLEA-18 o preinmune según se describe en la sección de materiales y métodos. La presencia de la proteína PvLEA-18 en los tejidos vegetales se aprecia como una coloración azul por ser producto de la reacción de la fosfatasa alcalina, acoplada al segundo anticuerpo, con los substratos NBT y BCIP (consultar los materiales y métodos para mayor información). Las tres filas de fotografías vistas de arriba hacia abajo son secciones transversales de las diferentes regiones de desarrollo del hipocotilo: (A,B,C) la zona de división; (D,E,F) la zona de elongación; (G,H,I) y la zona madura. Y las tres columnas vistas de izquierda a derecha corresponden a: (A,D,G) inmunolocalizaciones hechas con el antisuero anti-PvLEA-18 a partir de plántulas control; (B, E, H) inmunolocalizaciones hechas con el antisuero anti-PvLEA-18 a partir de plántulas estresadas. Finalmente, las reacciones hechas con el suero preinmune a partir de plántulas estresadas corresponden a la columna de fotografías (C,F,I). Todas las fotografías corresponden a ampliaciones 10x. c, córtex; p, parénquima medular; e,epidermis.



En este Capítulo hemos demostrado que PvLEA-18 es un miembro de una nueva familia de proteínas LEA muy conservada en el reino vegetal, cuya acumulación se promueve en tejidos de *P. vulgaris* que sufren procesos de deshidratación o donde se acumulan concentraciones significativas de osmolitos. Aún no podemos establecer la relación existente entre la acumulación de osmolitos y la presencia de PvLEA-18. Podemos pensar que las altas concentraciones de osmolitos, al disminuir el potencial osmótico (disminuyendo el agua disponible en la célula) podría inducir una mayor expresión del gen *Pvlea-18*. Pero esto no concuerda con los datos de acumulación de ARNm ni explica el fenómeno de la estabilización de la proteína. Por otra parte, se sabe que el ajuste osmótico que se verifica en las plántulas de algunas especies durante su aclimatación al déficit hídrico [Meyer y Boyer, 1979; Meyer y Boyer, 1981; Creelman et al. 1990], se desarrolla principalmente a través de la acumulación de carbohidratos solubles. Esto se ha comprobado en soya [Meyer y Boyer, 1981] y en trigo [Munns, 1979]. Recientemente se ha sugerido que las proteínas LEAs hidrofílicas tienen la capacidad de unirse fuertemente a carbohidratos solubles [Walters et al., 1997]. Este fenómeno podría explicar la mayor estabilidad de PvLEA-18 y, por lo tanto, su mayor acumulación en la región apical del hipocotilo. Creelman et al., (1990) reportaron también un aumento en el contenido de azúcares en los meristemos de raíces laterales de plántulas de soya sometidas a déficit hídrico, donde hemos detectado una importante acumulación de PvLEA-18 en los experimentos de inmunolocalización. Así, la presencia de PvLEA-18 en tejidos o células en los que se verifica una alta acumulación de osmolitos (embiones, germínulas, la región de crecimiento del hipocotilo, los meristemos de raíces laterales y las vesículas del xilema) podría estar relacionado con la capacidad de esta proteína hidrofílica no globular para capturar agua y/o proteger macromoléculas celulares en células con una baja disponibilidad de agua. La presencia de PvLEA-18 en una gran variedad de tejidos y tipos celulares diferentes, así como en distintos compartimentos celulares (al menos el citoplasma y el núcleo), sugiere que esta proteína desarrolla una función osmoprotectora general.

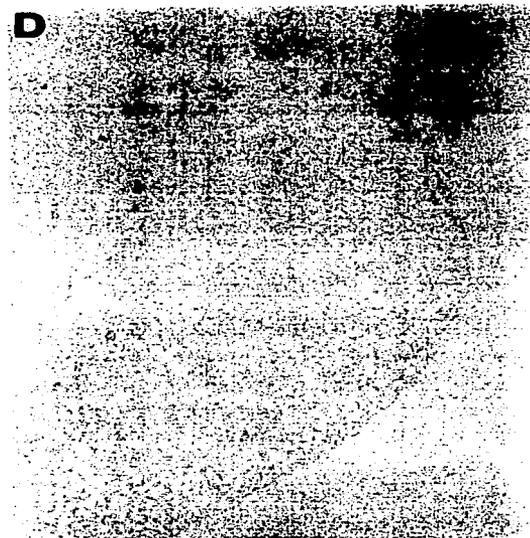
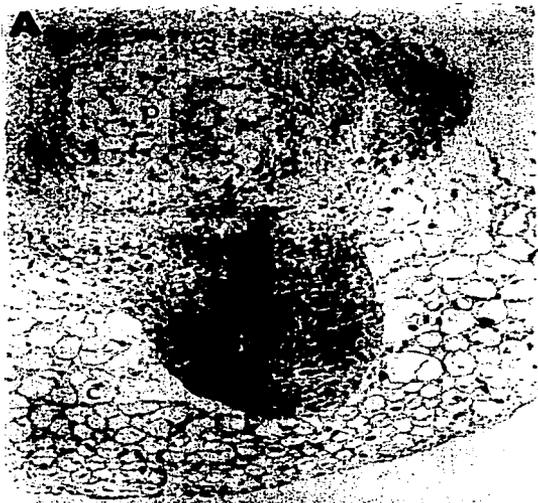
**Fig. 14:** Distribución de PvLEA-18 en los tejidos de las regiones de desarrollo del hipocotilo de plántulas control y plántulas sometidas a déficit hídrico. Se procedió según se explica en la Figura 13. La distribución de las secciones es idéntica a la de la figura 13. Todas las imágenes están ampliadas x15. c, córtex; p, parénquima medular; e, epidermis.



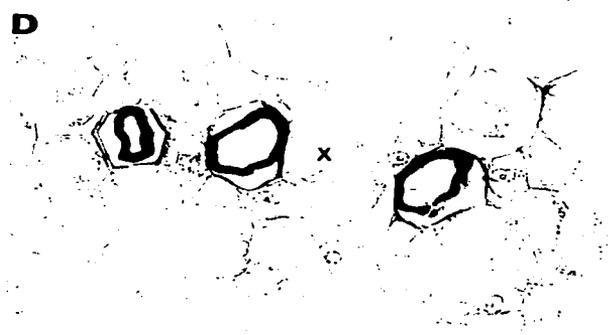
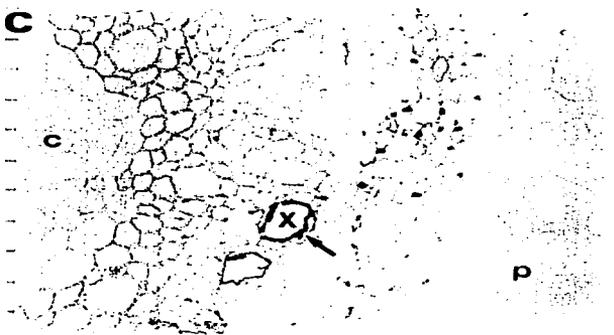
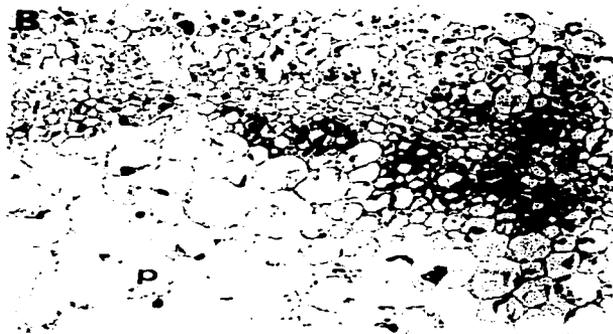


**Fig. 15:** Acumulación de PvLEA-18 en los núcleos de células de la epidermis y el córtex de la región de división de plántulas sometidas a déficit hídrico. Se procedió conforme a lo descrito en la Figura 13. La imagen está ampliada x100

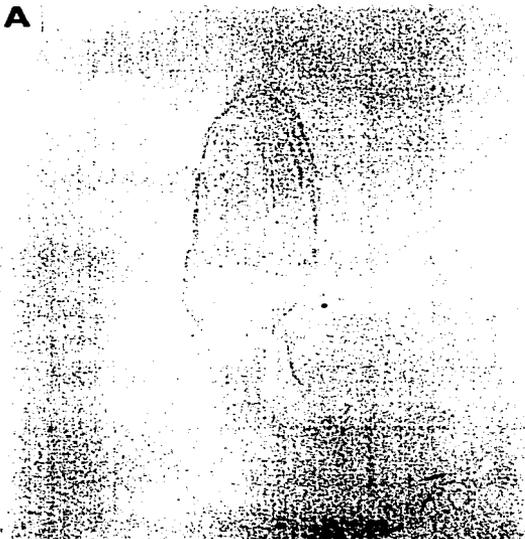
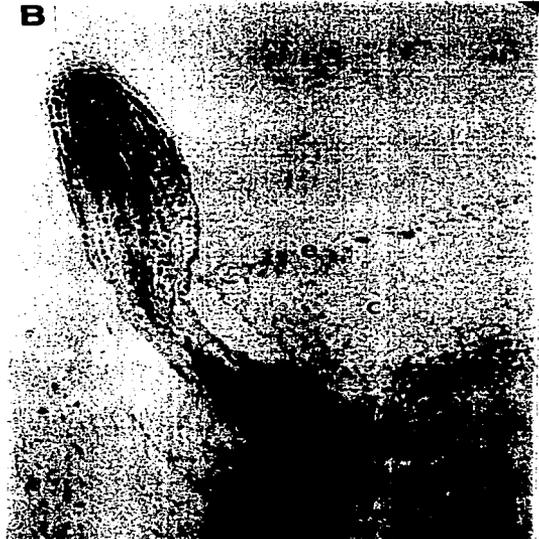
**Fig. 16:** Distribución de PvLEA-18 en la raíz y el hipocotilo de embriones con 36h de desarrollo desde que da inicio la germinación. Se procedió conforme a lo descrito en la Figura 13. **A** Sección transversal de la radícula incubada con el antisuero anti-PvLEA-18. **B** Sección transversal de la radícula incubada con el antisuero preinmune. **C** Sección transversal del hipocotilo incubado con el antisuero anti-PvLEA-18. **D** Sección transversal del hipocotilo incubado con el antisuero preinmune. Las imágenes están ampliadas x 15. c, córtex; p, parénquima medular; e, epidermis; m, meristemo de raíz lateral.



**Fig. 17:** Acumulación PvLEA-18 en las vesículas del xilema en las regiones de desarrollo del hipocotilo y en la raíz. Se procedió conforme a lo descrito en la Figura 13. En todos los casos se muestran reacciones con el antisuero anti-PvLEA-18 **A** Sección transversal del hipocotilo de embriones con 36h de desarrollo. Una célula del protoxilema está indicada con una flecha. Imagen ampliada x 20. **B** Sección transversal de la región de división del hipocotilo. Una célula del protoxilema está indicada con una flecha. Imagen ampliada x 20. **C** Sección transversal de la región madura de la raíz. Una célula del protoxilema está indicada con una flecha. Imagen ampliada x 20. **D** Sección transversal de la región madura del hipocotilo. Imagen ampliada x 60. **E** Detalle de una vesícula del xilema de la región madura del hipocotilo. Imagen ampliada x 100. **F** Detalle de un grupo de vesículas del xilema de la región madura del hipocotilo. Imagen ampliada x 40. c, córtex; p, parénquima medular; x, vesícula del xilema; n, núcleo.



**Fig. 18:** Acumulación PvLEA-18 en las raíces laterales emergentes. Se procedió conforme a lo descrito en la Figura 13. En todos los casos se muestran reacciones con el antisuero anti-PvLEA-18. **A** Sección transversal de la región madura del hipocotilo y sección longitudinal de una raíz lateral emergente de una plántula sometida a déficit hídrico, incubada con el antisuero preinmune. Imagen ampliada x 20. **B** Sección transversal de la región madura del hipocotilo y sección longitudinal de una raíz lateral emergente de una plántula sometida a déficit hídrico, incubada con el antisuero anti-PvLEA-18. Imagen ampliada x 20. **C** Detalle de la sección longitudinal de la raíz lateral, incubada con antisuero anti-PvLEA-18. Imagen ampliada x 40. c, córtex; p, parénquima medular; vc, cilindro vascular; e, epidermis; rt, meristemo radicular; rc, cofia.

**A****B****C**

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

Los siguientes métodos son iguales a los ya descritos en el Capítulo 2 de este trabajo:

- Material vegetal y condiciones de crecimiento
- Mediciones de los potenciales hídricos y osmóticos
- Aislamiento de ARN y ensayo tipo northern
- Marcaje de las sondas
- Cuantificación de las bandas de autoradiografías por densitometría

A continuación describo los métodos nuevos empleados en este capítulo.

### **Purificación de la proteína PvLEA-18 y producción del anticuerpo**

El ADNc correspondiente al gen *Pvlea-18* se clonó el vector pGEX3 para la sobreexpresión de dicho gen en *E. coli* [Ausubel et al., 1985]. La proteína PvLEA-18 fusionada a la enzima glutatión transferasa (GST) se purificó por cromatografía de afinidad usando una resina de agarosa con la molécula glutatión acoplada según se describe en [Ausubel et al., 1985]. Usando como antígeno la proteína de fusión GST-PvLEA-18, se produjeron anticuerpos en conejo según los métodos convencionales descritos por Harlow y Lane (1988). Después de eliminar las células del suero sanguíneo por centrifugación, la fracción de IgG se purificó por el método del ácido caprílico/sulfato de amonio Harlow y Lane (1988). Los anticuerpos que reconocían específicamente a GST-PvLEA-18 se purificaron por inmovinoafinidad usando dicho antígeno covalentemente acoplado a Sepharosa-4B activada con Bromuro de Cianógeno (Sigma). El acoplamiento se llevó a cabo a 4°C durante 12h. Los sitios libres se saturaron con etanolamina (0.2 M) durante 1h. La resina acoplada se transfirió a una columna y se empleó en la purificación del anticuerpo según se describe en [Harlow y Lane, 1988].

### **Extracción de proteínas y análisis tipo western**

Los tejidos vegetales se homogeneizaron en un mortero en presencia de nitrógeno líquido y se incubaron en una solución de acetona que contiene ácido tricloroacético (TCA) al 2% y 2-mercaptoetanol al 0.3% v/v. Después de centrifugar, las proteínas, el pellet se lavó tres veces con acetona 100% a -20°C. La pastilla resultante se secó al vacío y se resuspendió en solución laemli (Laemli, 1970). Cuando se requería de extractos de proteínas resistentes a hervor, la pastilla seca se resuspendió en solución PBS conteniendo 400 mM de Na Cl, se hirvió durante 10 mnt y se centrifugó a 14,000 g durante 15 mnt. La cantidad de proteína se cuantificó mediante el método de Bradford usando el

ensayo de proteínas (Biorad) según describen los fabricantes. Las proteínas totales se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) después de hervir los extractos durante 3 mnt (Laemli, 1970). Las proteínas resueltas en el gel SDS-PAGE se transfirieron a un filtro de nitrocelulosa de acuerdo al método descrito por Towbin et al., (1979). Se empleó una dilución 1:1,500 de la fracción de IgG del antisuero anti-PvLEA-18 o una dilución 1:150 de la proteína inmunopurificada, así como una dilución 1:10,000 del anticuerpo anticonejo conjugado a peroxidasa. El revelado se realizó con el kit de detección por quimioluminiscencia ECL (Amersham)

### **Cuantificación de PvLEA-18 en tejidos de plantas**

La estimación se realizó usando la proteína de fusión purificada como patrón en un ensayo tipo western en el que se comparan diferentes cantidades de la proteína GST-PvLEA-18 con diferentes cantidades del extracto vegetal. Un análisis densitométrico de las señales correspondientes a la banda de 14 KDa comparado con la curva estándar obtenida de los valores de las bandas del patrón PvLEA-18, indicó que la señal de 1µl de extracto vegetal equivale aproximadamente a la de 1ng de proteína purificada. Dado que la proteína de fusión es 3 veces más grande que PvLEA-18, la equivalencia se convierte en 3ng de PvLEA-18/µl de extracto. Como sabemos que el extracto procede de 300 mg de tejido fresco posteriormente liofilizado y resuspendido en un volumen final de 300 µl de buffer laemli, existe una equivalencia de 1µl de extracto/mg de tejido fresco, que según la relación antes calculada se convierte en 3ng de PvLEA-18/mg de tejido fresco, o lo que es lo mismo, 3µg de PvLEA-18/g. de tejido fresco. Ya que la muestra se liofilizó, pudimos estimar el contenido de agua de los 300 mg de tejido fresco por comparación de pesos, lo que nos arrojó una cantidad de 641 µl de agua/g de tejido fresco. Dado el peso molecular de PvLEA-18, correspondiente a 8.7 KDa, estimamos que en embriones hidratados durante 36h, la concentración de PvLEA-18 es de 0.51 µM.

### **Inmunocitoquímica**

Se emplearon plántulas etioladas de 5d de edad que fueron alternativamente transplantadas a vermiculita bien hidratada o a vermiculita subhidratada donde estuvieron durante 72h antes de ser cosechadas (ver detalles en Cap. 2). También se emplearon ejes embrionarios de 36h de desarrollo. El material vegetal se disecó en piezas de 4-8 mm y se fijó a temperatura ambiente durante 1h al vacío más otras 12h sin vacío en una solución de fosfato de sodio 10 mM (pH 6.8) con paraformaldehído (4% peso/v), glutaraldehído (0.25% v/v) y NaCl 1M. Los tejidos fijados se deshidrataron y

embebieron en parafina según el procedimiento descrito por Van de Wiel et al., (1990). Se cortaron secciones de  $7\mu\text{M}$  de espesor con un microtomo manual, se montaron sobre portaobjetos y las muestras se rehidrataron según el procedimiento descrito por Van de Wiel et al., (1990). Para la reacción inmunológica, las muestras se bloquearon durante 12h a  $4^{\circ}\text{C}$  en una solución de PBS (1x) con 0.1% de tween-20 y albúmina de suero bobino (BSA) al 5% . A continuación se incubó durante 2h a temperatura ambiente con una dilución 1:50 del anticuerpo inmunopurificado diluido en solución de bloqueo. Después de 4 lavados de 5 mnt con solución de bloqueo, las muestras se incubaron con el anticuerpo-anticonejo con fosfatasa alcalina acoplada (Boehringer) diluido 1:1,500 en solución de bloqueo. Se realizaron 4 lavados de 5 mnt en una solución de PBS (1x) antes de revelar las muestras en una solución de Tris, pH 9.5, 100 mM de NaCl, 50 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 mg/ml de Nitrobluetetrazolium (NBT) (Boehringer) y 0.2 mg/ml de 5-Bromo-3-Cloro indolilfosfato. Las muestras se volvieron a deshidratar antes de ser montadas con Permount.

## VI. BIBLIOGRAFÍA

- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (1989).** Current Protocols in Molecular Biology. In Editor, Eds. (New York, John Wiley and Sons). pp. Pages.
- Close, T.J. (1996).** Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiol. Plant* **97**: 795-803.
- Close, T.J., Fenton, R.D., Yang, A., Asghar, R., and DeMason, D.A., et al (1993).** Dehydrin: the protein. In Plant responses to cellular dehydration during environmental stress. T. J. Close and E. A. Bray, Eds. (Rockville, MD, Am. Soc. Plant Physiol.). pp. 104-118.
- Colmenero-Flores, J.M., Campos, F., Garcíarrubio, A., and Covarrubias, A. (1997).** Characterization of *Phaseolus vulgaris* cDNA clones responsive to water deficit: identification of a novel late embryogenesis abundant-like protein. *Plant Mol. Biol.* **In press**:
- Creelman, R.A., Mason, H.S., Bensen, R.J., Boyer, J.S., and Mullet, J.E (1990).** Water deficit and abscisic acid cause differential inhibition of shoot versus root growth in soybean seedlings. *Plant Physiol.* **92**: 205-214.
- Dure III, L. (1993a).** A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. *Plant J.* **3**: 363-69.
- Dure III, L. (1993b).** Structural motifs in Lea proteins. In Plant responses to cellular dehydration during environmental stress. T. J. Close and E. A. Bray, Eds. (Rockville, MD, American Society of Plant Physiologists). pp. 91-103.
- Goday, A., Jensen, A., Culiáñez-Macià, F.A., Albà, M.M., Figueras, M., Serratos, J., Torrent, M., and Pagés, M. (1994).** The maize abscisic acid responsive protein rab17 is located in the nucleus and cytoplasm and interacts with nuclear localization signals. *Plant Cell* **6**: 351-360.
- Godoy, J.A.e.a. (1994).** Expression, tissue distribution and subcellular localization of dehydrin TASI4 in salt-stressed tomato plants. *Plant Mol. Biol.* **26**: 1921-1934.
- Imai, R., and al., e. (1996).** A *lea*-class gene of tomato confers salt and freezing tolerance when overexpressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **170**: 243-248.
- Ingram, J., and Bartels, D. (1996).** The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**: 377-403.
- McCubbin, W.D., and Kay, C.M. (1985).** Hydrodynamics and optical properties of the wheat Em protein. *Can. J. Biochem.* **63**: 803-810.
- Meyer, R.F., and Boyer, J.S. (1972).** Sensitivity of cell division and cell elongation to low water potentials in soybean hypocotyls. *Planta* **108**: 77-87.
- Meyer, R.F., and Boyer, J.S. (1981).** Osmoregulation in soybean seedling having low water potentials. *Planta* **151**: 482-489.
- Mundy, J., and Chua, N. (1988).** Abscisic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene. *EMBO J.* **7**: 2279-2286.

**Munns, R., Brady, C.J., and Barlow, E.W.R.**(1979). Solute accumulation in the apex and leaves of wheat during water stress. *Aust. J. Plant Physiol* **6**: 379-389.

**Niogret, M.F., Culiáñez-Macià, F.A., Goday, A., Albà, M.M., and Pagès, M.** (1996). Expression and cellular localization of *rab28* mRNA and Rab28 protein during Maize embryogenesis. *Plant J.* **9**: 549-557.

**Nonami, H., and Boyer, J.S.**(1993). Direct demonstration of a growth-induced water potential gradient. *Plant Physiol.* **102**: 13-19.

**Roberts, J.K., DeSimone, N.A., Lingle, W.L and Dure III, L.** (1993). Cellular concentrations and uniformity of cell-type accumulation of two lea proteins in cotton embryos. *Plant Cell.* **5**: 769-780.

**Taylor, B.H., Manhart, J.R., and Amasino, R.M.** (1993). Isolation and characterization of plant DNA. In *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*. B. R. Glick and J. E. Thompson, Eds. (Boca Ratón, CRC-Press). pp. 37-47.

**Walters, C., Walker-Simmons, M.K., and Ried, J.L.** (1997). Heat-soluble proteins extracted from wheat seed embryos have tightly bound sugars and unusual hydration properties. Abstract number 503.

**Xu, D.P.e.a.** (1996). Expression of a late embryogenesis abundant protein gene , HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol.* **110**: 249-257.

## CAPÍTULO 4

# EL PAPEL DE LAS PROTEÍNAS HIDROFÍLICAS COMO OSMOESTABILIZADORES EN LA NATURALEZA

### I. INTRODUCCIÓN

En el capítulo 1 hablamos de los osmolitos compatibles como las moléculas mejor caracterizadas como osmoestabilizadores. A los osmolitos compatibles se les ha llamado también chaperonas químicas por su capacidad de estabilizar proteínas y sistemas membranales en condiciones de falta de agua y altas temperaturas. Estas moléculas sin embargo estabilizan a través de mecanismos diferentes a los empleados por las verdaderas chaperonas moleculares. También hemos discutido la probable implicación de las proteínas de choque térmico de bajo peso molecular (lmwHSPs) en dicho proceso por su participación en el proceso de embriogénesis tardía y en la respuesta de los tejidos vegetativos a la deshidratación. Las proteínas de embriogénesis tardía (LEAs) se describieron como posibles estabilizadores en condiciones de déficit hídrico dadas sus propiedades estructurales (polipéptidos muy hidrofílicos y extendidos), que las convierte en buenas atrapadoras de agua. Sin embargo, no se ha podido demostrar aún que estabilicen macromoléculas celulares. Otro sistema biológico muy estudiado en el que se requieren condiciones de osmoestabilización y en el que se han descrito moléculas estabilizadoras diferentes a las mencionadas, es el cristalino del ojo de los animales. En este órgano se acumulan en concentraciones elevadísimas diversas familias de proteínas conocidas como cristalinas. Las únicas cristalinas a las que se les ha comprobado una función estabilizadora *in-vitro* son las  $\alpha$ -cristalinas, que resultaron pertenecer a la familia de las proteínas de choque térmico de bajo peso molecular (lmw-HSPs) [revisado en Wistow et al., 1994].

En nuestro grupo estamos muy interesados en comprobar si la presencia de las proteínas LEAs no es exclusiva del reino vegetal, y si proteínas hidrofílicas homólogas funcionan en otros organismos como mecanismo de aclimatación al déficit hídrico. También estamos interesados en entender los mecanismos de osmoestabilización que pudieran ejercer este tipo de proteínas. Los mecanismos de osmoestabilización mejor estudiados son los relacionados con los compuestos conocidos como osmolitos compatibles. A continuación

presento una pequeña revisión sobre este tema.

## 1. Osmolitos perturbadores y osmolitos compatibles

¿Por qué existen solutos que disminuyen la estabilidad de las moléculas (por ejemplo, facilitan la pérdida de la conformación nativa de las proteínas), mientras que otros, aparentemente similares, no las afectan o, incluso, las estabilizan? Las sales como el KCl y el NaCl afectan a la velocidad de catálisis y a la  $K_m$  de numerosas enzimas cuando están presentes a relativamente bajas concentraciones (50-150 mM) en el interior de las células de múltiples organismos. Pero, además, el ión  $\text{Na}^{++}$  es mucho más perturbador que el ión  $\text{K}^+$ , siendo ambos cationes. Por otra parte, el glicerol y otros polioles se llegan a acumular en ciertos organismos hasta concentraciones de 4M sin que inhiba las funciones de las macromoléculas celulares.

### 1.1. Interacción con ligandos y sitios activos

Los osmolitos compatibles se caracterizan por no interactuar con los ligandos (substratos, cofactores y moduladores) de las enzimas ni con sus sitios activos. Por ejemplo, el ión  $\text{K}^+$  interactúa con el sitio activo de la fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPc), aumentando su  $K_m$ . La arginina ha mostrado ser un frecuente inhibidor de enzimas, por ejemplo, de muchas enzimas glicolíticas. Los residuos de arginina están presentes en los sitios activos de este grupo de enzimas y de muchas otras, donde interactúan directamente con los ligandos fosforilados (cargados negativamente). La arginina libre también tiene afinidad por dichos ligandos, por lo que impide la interacción de estos con los sitios activos de las enzimas. Ningún osmolito compatible posee carga neta positiva, y sólo la octopina posee una carga neta negativa. Los osmolitos compatibles, por lo tanto, carecen de cargas o son zwitteriones a pH fisiológico [revisado en Yancey, 1982].

### 1.2. Las series de Hofmeister y su paralelismo con el comportamiento de los osmolitos orgánicos

Hofmeister encontró que las sales neutras poseen efectos muy diferentes en la estructura y la solubilidad de las proteínas y otros coloides. Organizó a diversos cationes y aniones en una serie donde quedaron ordenados según los grados de perturbación o estabilización que ejercen sobre la estructura de las macromoléculas (Fig.1). Se comprobó además que diferentes niveles de conformación macromolecular eran afectados igualmente por los

iones en el mismo orden en que aparecen en la serie de Hofmeister (desnaturalización, agregación-desagregación, polimerización-despolimerización, etc.). Se hizo además la observación de que los efectos de los iones era algebraicamente aditivo, de modo que, por ejemplo, el efecto desestabilizador del  $I^-$ , se contrarresta con la adición de  $SO_4^{2-}$  o  $NH_4^+$ . Cuando se comenzaron a caracterizar los osmolitos compatibles en la naturaleza, se comprobó que existe un paralelismo entre los iones estabilizadores y los grupos funcionales de los osmolitos orgánicos que favorecen la estructura nativa de las macromoléculas (Fig.1). Según estas observaciones, los aminoácidos son homólogos al acetato de amonio, la taurina al sulfato de amonio y la metilamina a las sales de amonios cuaternarios. Así, la naturaleza de las interacciones de los iones de la serie de Hofmeister con las macromoléculas parece ser la misma que operan en los osmolitos compatibles seleccionados por los organismos en la naturaleza. Con excepción de la prolina, todos los aminoácidos y metilaminas que funcionan como osmoestabilizadores aumentan la temperatura de desnaturalización ( $T_m$ ) de la ribonucleasa, mientras que es disminuida por la urea, la arginina y el ión guanidina. Otra observación interesante es que, al igual que en la serie de Hofmeister, el grado de metilación de los átomos de nitrógeno de iones amonio es proporcional al grado de estabilización que ejerce el osmolito orgánico. La trimetil amina N-óxido (TMAO) es mejor estabilizador de diversas enzimas comparada con la betaína, y ésta es mejor que la sarcosina [revisado en Yancey, 1982] (ver Fig. 1).



## 2. Mecanismos de estabilización de los osmolitos

Aunque se sigue sin entender bien el fenómeno de la estabilización, se han realizado numerosos estudios y observaciones empíricas que han permitido ahondar en el fenómeno.

### 2.1. Efecto de los osmolitos sobre la solubilidad de las macromoléculas

Las sales neutras afectan diferencialmente a la solubilidad de las macromoléculas en la misma medida en que afectan a su estructura. Por ejemplo, el sulfato de amonio, un buen estabilizador, se emplea como agente que precipita proteínas en sus conformaciones nativas. Los procesos de ensamblaje de las macromoléculas están también relacionados con su grado de solubilidad. Existe un paralelismo entre la capacidad de las sales neutras de estabilizar la estructura terciaria de las proteínas y su capacidad de promover mayores órdenes de organización estructural. Así, la TMAO potencia fuertemente la agregación de la enzima fosfo-fructoquinasa (PFK), disminuyendo su disociación en dímeros no funcionales. De nuevo en este fenómeno se observa una correlación de estabilización según el grado de metilación. Las sales neutras (KCl + NaCl) producen un aumento de la fuerza iónica del medio, lo que induce la disociación de H<sup>+</sup> y un aumento de las cargas negativas de los miofilamentos de células musculares. Esto produce una mayor hidratación de las fibras de los miofilamentos que conduce a su disrupción. Este fenómeno se contrarresta si además de dichas sales se añade TMAO, ciertos aminoácidos o glicerol [revisado en Yancey, 1982].

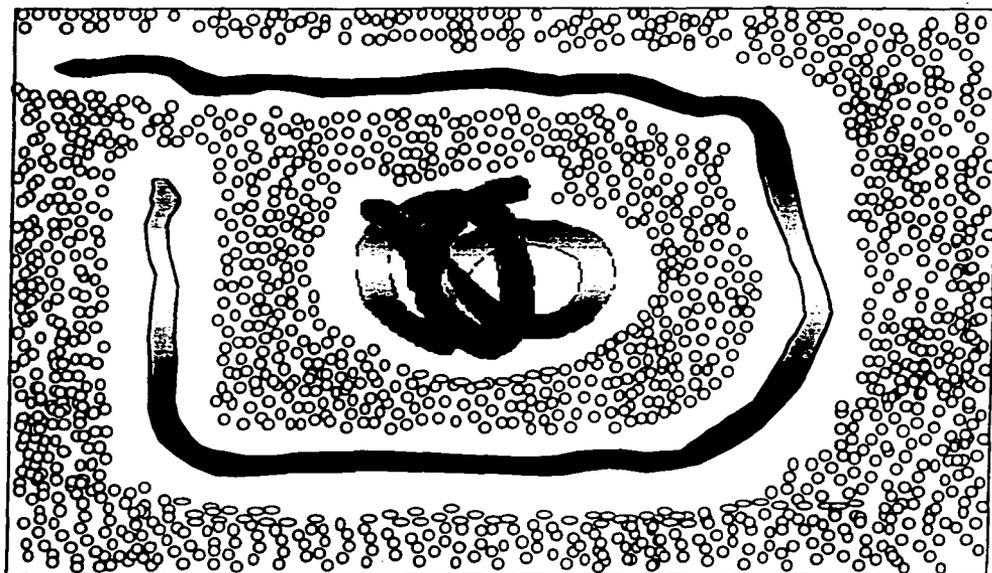
### 2.2. Efecto de los osmolitos por interactuar directamente con las macromoléculas

Existe controversia acerca de si el modo de acción de los osmolitos pasa por una interacción directa con las macromoléculas o se ejerce a través de los efectos que producen en el solvente y, por lo tanto, a través de la interacción entre el solvente y las macromoléculas disueltas en éste. En cualquier caso estas posibilidades no son excluyentes. En teoría los osmolitos pueden afectar a los grupos cargados, polares o no polares de las proteínas de forma tal que disminuyan o aumenten sus afinidades hacia el solvente, lo que hace que, paralelamente, pueda aumentar o disminuir sus afinidades hacia otros grupos intra o intermoleculares [revisado en Yancey, 1982]. Se ha propuesto por ejemplo que el glutamato, que funciona como un efectivo crioprotector, interacciona con la superficie de las proteínas, lo que ocasionaría un aumento de sus cargas y, en consecuencia, una mayor hidratación de éstas.

Esto tendría un efecto estabilizador sobre las proteínas en un ambiente de deshidratación. Esto no explica sin embargo que diversos osmolitos, en los que varía ampliamente el grado de hidrofobicidad, de carga, de orientación de los dipolos y de estructura primaria, sean eficaces crioprotectores de proteínas [revisado en Crowe et al., 1990]. La mayoría de las evidencias disponibles indican que las interacciones directas, lejos de estabilizar, desestabilizan la estructura de las biomoléculas. Por ejemplo, el hidrocloreuro de guanidina y la urea, potentes desnaturizantes, operan a través de una unión directa con las proteínas (Fig. 3), que se sabe que favorecen termodinámicamente su desnaturización [Prakash et al., 1981]. Todas las sales son atraídas electrostáticamente por los dominios polares de las proteínas, uniéndose a ellos. Sólo cuando esas uniones son contrarrestadas por fuerzas repulsivas, es cuando una sal estabiliza a una proteína [Arakawa y Timasheff, 1982].

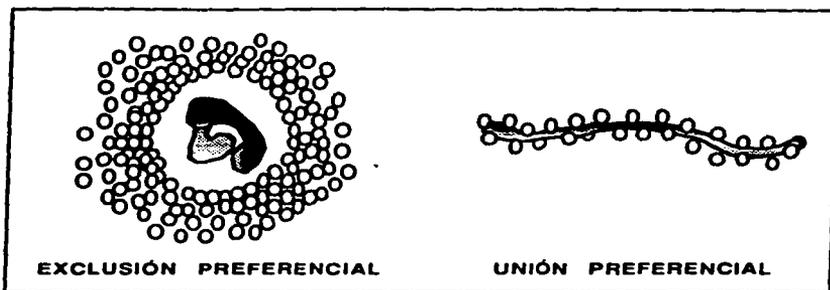
### 2.3. Exclusión preferencial del osmolito

Se ha comprobado experimentalmente que los solutos que estabilizan proteínas en solución tienden a interactuar principalmente con el agua, y son preferencialmente excluidos del contacto con la superficie de dichas proteínas, lo que supone un ordenamiento del sistema (Fig. 2). Las proteínas tienden a mantenerse plegadas porque su desnaturización aumentaría su superficie de contacto con el medio o superficie de exclusión, lo que supondría un aumento del orden del sistema, que está termodinámicamente desfavorecido. A la inversa, si el osmolito tuviese afinidad por unirse a la proteína, estaría termodinámicamente favorecida su desnaturización (Fig. 3) [revisado en Crowe et al., 1990].



**Fig.2:** Teoría de la exclusión preferencial. Dado que los osmolitos compatibles (círculos) tratan de evitar el contacto con la superficie de la proteína, se tiende a generar un orden. Si la proteína se desnaturalizase, aumentaría mucho su superficie de exposición al medio, lo que aumentaría el grado de ordenamiento del sistema, lo cual está termodinámicamente desfavorecido. El sistema trata de mantener la proteína plegada, lo que supone un aumento de su estabilidad.

El grado de estabilidad de las proteínas se deriva de un balance entre los efectos desestabilizantes de los solutos con afinidad para unirse a ella, frente al efecto estabilizante de los solutos que se excluyen de su superficie (Fig. 3).



**Fig.3:** Cuando un osmolito tiene tendencia por unirse a una protefna, facilita su desnaturalización

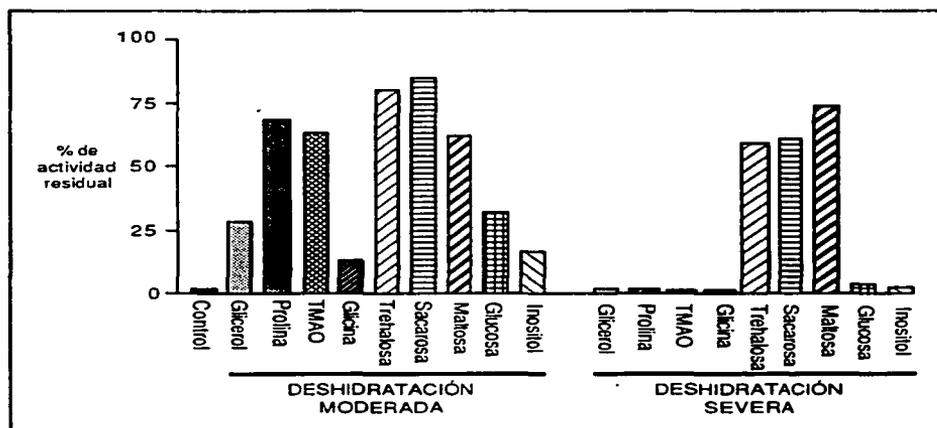
Se han estudiado diversos osmolitos con capacidad para crioprotger a la enzima PFK. Todos los que se excluían de la enzima resultaron ser estabilizadores, mientras que aquéllos con capacidad de unión a la PFK no estabilizaron (Tabla 1, tomada de Crowe et al, 1990).

**Tabla 1:** Solutos compatibles y perturbadores

COMPUESTO	GRADO DE ESTABILIZACIÓN (% DE LA ACTIVIDAD INICIAL)	MODO DE INTERACCIÓN
Glicerol	70	Exclusión
Etilén glicol	100	Exclusión
Glucosa	50	Exclusión
Sacarosa	90	Exclusión
Inositol	40	Exclusión
Glicina	50	Exclusión
Prolina	50	Exclusión
Trehalosa	90	—
Acetato de sodio	80	Exclusión
Urea	0	Unión
H.Cl. Guanidina	0	Unión
Control	0	—

### 2.3. Reemplazo del H<sub>2</sub>O durante la deshidratación severa

Cuando el agua disponible pasa de ser escasa a desaparecer, el mecanismo de estabilización por exclusión preferencial deja de operar y muchos osmolitos que eran estabilizadores en condiciones de deshidratación moderada, salinización y congelamiento/descongelamiento, dejan de funcionar como estabilizadores (Fig. 4, tomada de Crowe et al, 1990). Este es el caso del glicerol, la prolina, la TMAO y la glicina. Sin embargo, un grupo de osmolitos que tienen en común ser disacáridos (trehalosa, sacarosa, maltosa, etc.), mantienen la estabilidad de las proteínas en condiciones de deshidratación severa.



**Fig.4:** Capacidad de protección de la actividad de la enzima PFK por parte de diversos osmolitos frente a deshidratación completa o deshidratación moderada

En condiciones de deshidratación severa los osmolitos necesariamente penetran la capa de hidratación de la macromolécula, por lo que el mecanismo de estabilización debe basarse ahora en algún tipo de interacción específica por parte de los disacáridos. Experimentos de espectroscopía infrarroja sugieren la participación extensiva de puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de la trehalosa y los residuos polares de las proteínas deshidratadas en presencia del disacárido. Ocurre entonces un reemplazo de las moléculas de agua por

moléculas del disacárido a medida que avanza el grado de deshidratación, que mantiene a las proteínas en su conformación nativa [revisado en Crowe et al, 1990]. Al parecer, las mismas interacciones ocurren con los grupos fosfato de las cabezas polares de los fosfolípidos cuando la sacarosa estabiliza sistemas membranales frente a la deshidratación.

### 2.5. Vitrificación

Se trata de un mecanismo por el que se ha propuesto que ciertos osmolitos compatibles, los disacáridos y oligosacáridos de mayor tamaño, protegen a las células de las semillas frente a la desecación. Se trata de la adquisición de un estado de sobresaturación que no conduce a la precipitación del osmolito, sino a la formación de un "cristal líquido" que adquiere propiedades mecánicas de un sólido [Koster, 1991]. En semillas secas viables de maíz se ha demostrado el estado de vitrificación y se ha correlacionado con la viabilidad de la semilla [Koster y Leopold, 1991]. Se sugiere que, durante la desecación, el "cristal líquido" rellena los espacios intra e intercelulares previniendo el colapsamiento y previniendo la difusión molecular propias de las reacciones químicas, lo que conduce a un estado estable de quiescencia [Koster, 1991].

### 3. Participación de proteínas en la osmoprotección

Hasta la fecha no se ha demostrado que moléculas diferentes a los osmolitos compatibles juegue un papel en la osmoprotección. En ocasiones se ha sugerido que otro tipo de moléculas pudieran participar también en la osmoprotección. Por ejemplo, en las semillas de ricino no se ha encontrado casi ningún contenido de disacáridos u oligosacáridos, aunque posee niveles anormalmente elevados de lípidos [Leopold, 1990]. Las esporas bacterianas tampoco contienen niveles significativos de azúcares, pero se ha mencionado la presencia de pequeños péptidos hidrofílicos de 6 aminoácidos con múltiples glicosilaciones que podrían estar implicados en la osmoprotección [Gould, 1986].

Ya sabemos acerca de la participación de las proteínas de choque térmico de bajo peso molecular (LMW-HSPs) y de las proteínas de embriogénesis tardía (LEAs) en las plantas, tanto en el proceso de desecación de las semillas como en la deshidratación de los tejidos vegetativos durante periodos de déficit hídrico. Las LMW-HSPs, como ya mencionamos, son chaperonas moleculares que, según sugieren nuestros resultados, podrían ser esenciales para asegurar un nivel de metabolismo celular en condiciones de potencial hídrico muy negativo (ver en Cap. 2). Las lmwHSPs y otras proteínas

de choque térmico a las que se les ha comprobado la función de chaperona molecular tienen la capacidad de unirse a sus substratos a través de interacciones hidrofóbicas para desarrollar su función estabilizadora [Lee et al., 1997]. Sobre las características estructurales de las LEAs nos remitiremos al capítulo 1 y 2. Respecto a su posible función, hemos mencionado en otros capítulos diversas hipótesis, como ser retenedoras de agua, solvadoras de estructuras citosólicas, chaperonas molecular en ambientes de deshidratación, o atrapadoras de iones tóxicos. Es muy improbable que, en caso de que las proteínas LEA funcionen como estabilizadores de proteínas, lo hagan a través de interacciones hidrofóbicas, como hacen las chaperonas moleculares, dado que generalmente son completamente hidrofílicas. Las funciones generales de protección de las proteínas LEAs en las plantas serían complementarias a la de los osmolitos, por lo que se podría esperar que, al igual que los osmolitos compatibles, este tipo de proteínas estuviesen conservadas en la naturaleza y presentes entre los múltiples sistemas biológicos que se adaptan a periodos de deshidratación. Hasta la fecha no se ha caracterizado ninguna proteína hidrofílica relacionada con las LEAs fuera del reino vegetal.

## II. REPORTE

# PARTICIPACIÓN DE PROTEÍNAS HIDROFÍLICAS, TIPO LEAs, EN LA RESPUESTA AL ESTRÉS OSMÓTICO EN ORGANISMOS DIFERENTES A LAS PLANTAS

José M. Colmenero-Flores\*, Adriana Garay\*, Alejandro Garcíarrubio y Alejandra A. Covarrubias

\* Participaron por igual en el desarrollo de este trabajo

### 1 Hipótesis

Dada la ubicuidad de las proteínas LEA en el reino vegetal, sus características estructurales y su posible participación en la aclimatación de las plantas al estrés osmótico, éstas deben estar presentes en otros organismos.

### 2. Objetivos

Usando criterios diferentes a la secuencia de aminoácidos, como el grado de hidrofiliidad y la composición de aminoácidos, rastreamos los banco de datos de proteínas en la búsqueda de polipéptidos estructuralmente relacionados a las proteínas LEAs de plantas para, posteriormente, comprobar su participación en la respuesta al estrés osmótico.

### 3. Resultados y discusión

#### 1. Búsqueda de proteínas tipo LEA en los bancos de proteínas totales usando el programa "PROPSEARCH"

El primer paso que dimos en la búsqueda de proteínas tipo LEAs fuera del reino vegetal fue usar un criterio más laxo que el empleado generalmente para estos fines, los programas 'FASTA' y 'BLASTA', que encuentran proteínas relacionadas basándose únicamente en homología a nivel de la secuencia primaria de aminoácidos. Para ello comenzamos usando el programa "PROPSEARCH", más sensible que los mencionados anteriormente para agrupar familias proteicas. Este programa no solo tiene en cuenta la secuencia de aminoácidos, sino también otros parámetros como el el tamaño de la proteína.

su contenido de aminoácidos, su hidropatía o su punto isoeléctrico. Las búsquedas con "PROPSEARCH" se hicieron a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína PvLEA-18 y de diferentes representantes de las diversas familias de proteínas LEAs de plantas. Encontramos que las proteínas seleccionadas por este programa eran muy variables en cuanto a algunos de los criterios de nuestro interés como el contenido de glicinas y la hidrofiliidad. Además, considerando incluso alguna de las familias de proteínas LEA originalmente agrupadas por el criterio secuencia de aminoácidos, el programa fracasó en distinguirlas como miembros de la misma familia. De todas formas, "PROPSEARCH" nos proporcionó una colección de secuencias de la que pudimos rescatar proteínas no vegetales con características de LEAs y cuya expresión está asociada a procesos de déficit hídrico. Se trata de la proteína CON10 y CON6 del hongo *Neurospora crassa* y de la proteína GSIB de *Bacillus subtilis* (Tabla 2). CON10 [Roberts et al., 1988] y CON6 [White y Yanofski, 1993] se inducen en la etapa tardía del desarrollo de las macroconidias o esporas de *N. crassa*. Al igual que las semillas de las plantas, las esporas son cuerpos de resistencia que maduran a través de un proceso de desecación. La proteína GSIB se induce en *Bacillus subtilis* en respuesta a estrés osmótico, oxidativo y calórico [Völker et al., 1994]. Como observación adicional, encontramos algunos grupos de proteínas que reiteradamente aparecían relacionadas con diferentes representantes de las familias LEA de plantas:

- Algunos tipos de proteínas de unión a ADN (proteínas "homeobox" y proteínas del grupo de alta movilidad).
- Proteínas de unión a ARN, muchas de las cuales son componentes de ribonucleopartículas.

## 2. Diseño de un programa para el rastreo de las proteínas de interés

Dado que "PROPSEARCH" resultó ser poco apropiado para el rastreo de proteínas LEA-like, decidimos diseñar un programa de rastreo de bancos de proteínas usando criterios más específicos. Nos basamos en las propiedades estructurales básicas más comunes que unifican a las diversas familias de proteínas LEA hidrofílicas: un grado elevado y continuo de hidrofiliidad y un alto contenido de glicinas. El programa escoge las proteínas tras asignarles un valor de puntuación basado en los siguientes parámetros:

- área hidrofílica del patrón hidropático (fil)
- área hidrofóbica del patrón hidropático (fob)
- Número de residuos de los dominios hidrofílicos (sumfil)
- Número de residuos de los dominios hidrofóbicos (sumfob)
- Número de dominios hidrofílicos (hitfil)
- Número de dominios hidrofóbicos (hitfob) :

- Número total de residuos (long)
- Número de glicinas (aa{G})

El programa calcula la puntuación de cada proteína al multiplicar por 10,000 el producto de la siguiente operación:

$$\text{fil/long} \times \text{sumfil/long} \times (10 \times \text{aa}\{G\}/\text{long}) - (15 \times \text{fob/fil} \times \text{hitfob})$$

donde:

- (fil/long) es la hidrofiliicidad promedio
- (sumfil/long) es la proporción de regiones hidrofílicas en la proteína
- (10 x aa{G}/long) es el parámetro que puntúa el contenido de glicinas
- (15 x fob/fil x hitfob) es un castigo por el contenido en regiones hidrofóbicas

A continuación rastreamos algunos bancos de proteínas usando este programa. Un criterio que evidenció la confiabilidad de este programa es que al rastrear los bancos de proteínas totales, reconoció a los diversos grupo de proteínas LEA hidrofílicas con buenos índices de puntuación (datos no mostrados). Sin embargo en estos bancos de proteínas encontramos mucho ruido de proteínas incompletas y de proteínas de organismos complejos en los que sería difícil un análisis posterior de la inducibilidad de los genes.

### 3. Búsqueda de proteínas tipo LEA en los genomas de *E. coli* y *S. cerevisiae*

Para evitar los problemas antes mencionados y para validar cuantitativamente nuestra hipótesis de que las proteínas tipo LEA presentes en otros organismos están relacionadas con el proceso de adaptación al estrés osmótico, decidimos rastrear genomas completamente secuenciados con el programa que diseñamos y determinar experimentalmente el porcentaje de aquellos genes elegidos en cada genoma que responde a un tratamiento de choque osmótico. Para ello se escogió a *E. coli* y a *S. cerevisiae* porque, además, son modelos de experimentación donde es sencillo la cuantificación de la expresión genética. Las proteínas (genes) que presentaron una máxima puntuación según los criterios del programa se enumeran y describen en la Tabla 1. De la lista obtenida a partir del genoma de levadura, además de escoger los genes con mayor puntuación y que mejor representan las propiedades estructurales de nuestro interés, escogimos algunos genes más que comenzaban a alejarse del criterio de consenso por presentar contenidos más reducidos de glicina. Observamos que varios de los genes escogidos en el

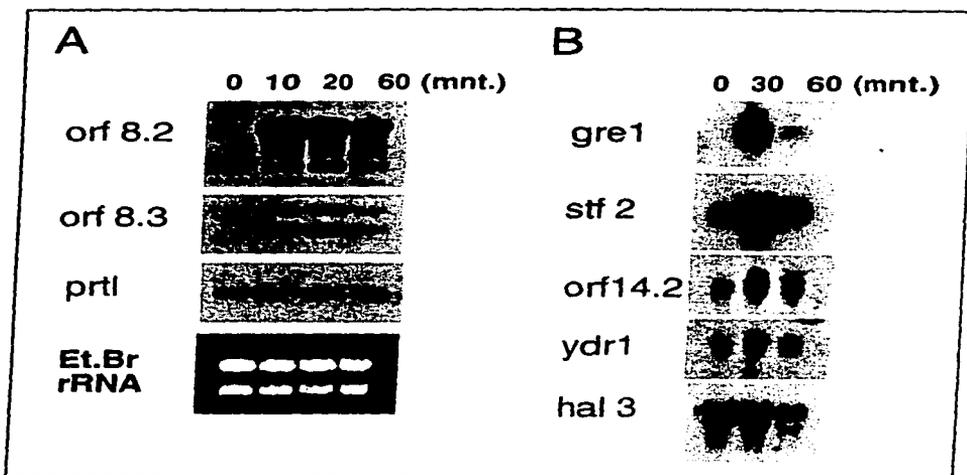
genoma de la levadura han sido descritos ya como de respuesta a estrés osmótico. En el caso de *E. coli*, ninguno ha sido descrito como implicado en la respuesta de dicho organismo al estrés osmótico.

#### 4. Ensayo de la respuesta a estrés osmótico de los genes encontrados

Para abordar este objetivo decidimos determinar si los genes presentes en la Tabla 1, y cuya regulabilidad por deshidratación no ha sido descrita, acumulan su transcrito en respuesta a un tratamiento de choque osmótico. Para ello hicimos ensayos tipo northern a partir de ARN total de cultivos de *E. coli* y *S. cerevisiae* sometidos a choque osmótico con sorbitol 0.5M. Los genes fueron amplificados por PCR usando oligos específicos de cada gen, lo que nos permitió además sintetizar las sondas radiactivas para los ensayos de hibridación. Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 2, donde se observa que todos los genes de *E. coli* y *S. cerevisiae* que codifican para las proteínas que mejor conservan las propiedades estructurales definidas, se inducen en respuesta al tratamiento osmótico. En el caso de la proteína de levadura GRE1, el gen correspondiente había sido clonado independientemente en nuestro laboratorio por A. Garay usando la técnica de "differential display" a partir de ARN total de levaduras sometidas a choque osmótico respecto a ARN total de levaduras control. El siguiente gen de la lista de levadura, que codifica para la proteína STF2, también presenta una clara inducción por estrés osmótico. Se trata de una probable estabilizadora de la interacción entre proteínas del complejo ATPasa mitocondrial de levadura [Yoshida et al., 1990]. De los tres genes que siguen en la lista de levadura, *sip18*, de función desconocida y *hsp12*, un gen que responde a choque térmico y a lípidos, han sido reportados ya como genes que responden a estrés osmótico. El ensayo con el gen *R7EB* (casi idéntico a *R7EA*) aún no se ha efectuado. Los genes que siguen en la lista de levadura comienzan a distanciarse de los criterios estructurales deseados ya que poseen menos del 10% de contenido en glicinas. El gen correspondiente al ORF18.3 no presentó inducción por choque osmótico, mientras que el transcrito del hipotético ORF21 no fue detectado en el ensayo y los dos últimos genes, aquéllos que codifican para el ORF14.2 y YDR1 presentan una débil inducibilidad por estrés osmótico.

Tabla 1: Relación de proteínas tipo LEAs obtenidas del genoma de *S. cerevisiae* y de *E. coli*

	GEN/ PROTEÍNA (nº de acceso)	(a) PUNTUACIÓN	TAMAÑO (nº de aa.)	hidrofíl. <sup>(b)</sup> hidrofób.	% Gly	INDUCIBILIDAD CONOCIDA	FUNCIÓN CONOCIDA	REFERENCIA
<i>S. cerevisiae</i>	GRE1 (S65242)	22,607	160	62	13.7	Estrés osmótico	--	Garay et al., en prepara- ción
	STF2 (STF2_YEAST)	19,230	83	139	12.0	--	Estabilizador de ATPasa	Yoshida et al., 1990
	SIP18 (SIP18_YEAST)	16,699	80	38	12.6	Estrés osmótico	--	Mirales y Serrano, 1
	R7EA y R7EB (R7EB_YEAST)	13,016	88	112	10.2	--	homólogas a proteínas ribosomales	--
	HSP12 (HS12_YEAST)	11,653	110	41	11.8	Estrés osmótico y térmico	--	Murakami et al., 1995
	ORF18.3 KD (YEMO_YEAST)	10,391	161	92	6.2	--	--	--
	ORF 21 KD (YN8D_YEAST)	10,377	187	53	8.0	--	--	--
	ORF 14.2 KD (YB44_YEAST)	8,702	124	56.6	6.5	--	--	--
	YDR1 (S57987)	7,604	176	74.3	6.2	--	--	--
	ORF 8.2 KD (YCIG_ECOLI)	35,097	78	23.7	23.3	--	--	--
<i>E. coli</i>	PRTL (PRTL_ECOLI)	15,112	34	30	8.8	--	--	Altman et al., 1981 Rossi et al., 1981
	ORF 8.3 KD (YBJ_ECOLI)	14,222	70	50.5	10	--	--	Blattner et al., 1993
	RMF (RMF_ECOLI)	12,071	56	26.6	9.1	Fase estacionaria	Factor modulador del ribosoma	Yamagishi et al., 1993

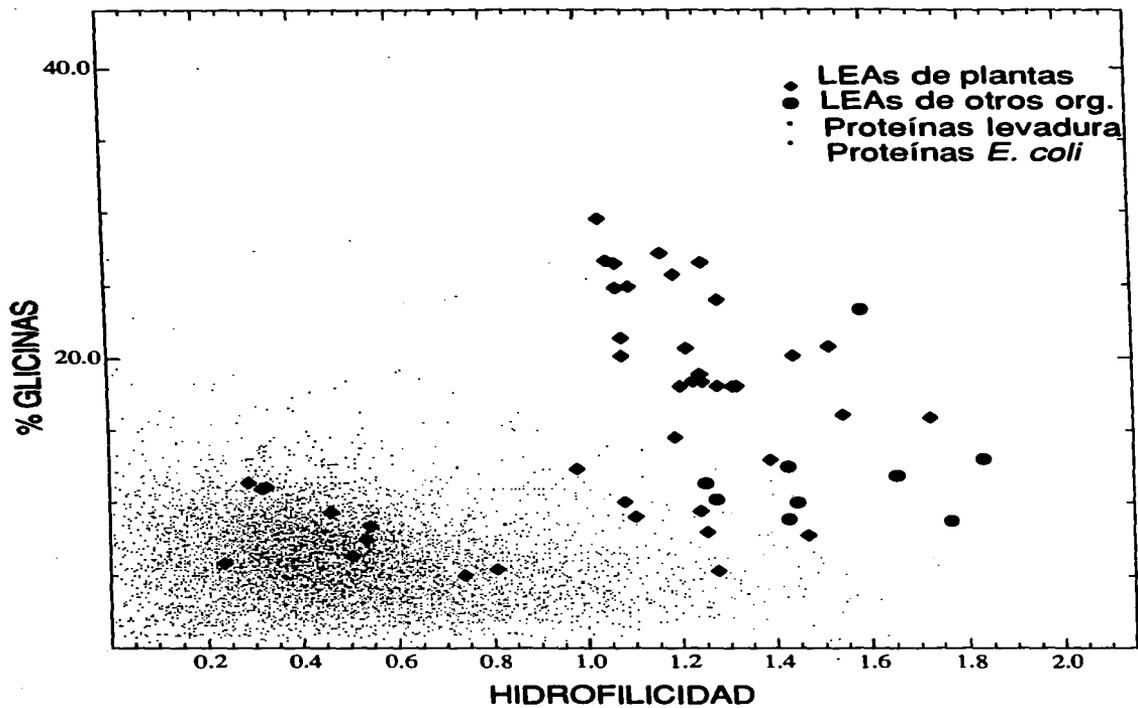


**Fig.1:** Cinética de expresión de genes tipo LEA de *E.coli* (A) y *S. cerevisiae* (B) después de aplicar un tratamiento de choque osmótico de 0.5 M de sorbitol en el medio de crecimiento.

De los ensayos tipo northern efectuados con los genes de *E. coli*, cuyas secuencias deducidas de aminoácidos conservan perfectamente el consenso estructural de las proteínas tipo LEA, comprobamos que tres de los cuatro genes seleccionados responden a estrés osmótico. El cuarto, que codifica para una proteína ribosomal que se induce en fase estacionaria no ha sido ensayado aún. Los genes que indicamos como *orf8.2* y *orf8.3* corresponden a genes desconocidos y catalogados como 'posibles ORFs' en el banco de genes del genoma de *E. coli*. Como hemos comprobado que efectivamente son genes y que responden a estrés osmótico, las llamamos *Osm8.2* y *Osm8.3*. El tercer gen que hemos comprobado que responde a estrés osmótico codifica para una proteína conocida como *prtI*, nombre que procede de "protamine-like" por ser homóloga a proteínas básicas llamadas protaminas. Se cree que las protaminas se unen al ADN cuando está en estado inactivo [Altman et al., 1981].

Para comparar las características estructurales de las proteínas tipo LEA de *E. coli* y *S. cerevisiae* con la de las LEAs de plantas y con el resto de las

proteínas totales de un organismo modelo, como *E. coli* y *S. cerevisiae*, graficamos el grado de hidrofiliidad frente al contenido en glicina de los grupos de proteínas mencionados (Fig. 2). Comprobamos que las proteínas LEA de plantas y las proteínas tipo LEA de *E. coli* y *S. cerevisiae* que se inducen en condiciones de déficit hídrico forman un grupo claramente distinguible de las proteínas totales de *E. coli* y *S. cerevisiae*. Las proteínas LEAs agrupadas junto con el grueso de las proteínas totales pertenecen a los grupos de LEAs atípicas que ya describimos en el capítulo introductorio. Las proteínas obtenidas en las búsquedas contra los bancos generales de proteínas junto con las búsquedas de los genomas de *E. coli* y *S. cerevisiae* muestran proteínas tipo LEA que se inducen en condiciones de déficit hídrico en dos reinos diferentes al de plantas: hongos y bacterias (Tabla 2). Dado que la existencia de proteínas muy hidrofílicas que responden a estrés osmótico en organismos diferentes a las plantas ha quedado demostrado, y dado que existen proteínas de embriogénesis tardía de plantas (LEA) que no son hidrofílicas (ver Fig.2), creemos necesario buscar un término que agrupe al conjunto de proteínas hidrofílicas que participan en la adaptación de diversos organismos a la falta de agua. En adelante nos vamos a referir a ellas como hidrofílicas. En la Tabla 2 presento el conjunto de datos de todas las hidrofílicas que hemos encontrado o caracterizado fuera del reino vegetal, junto con los representantes de las familias de LEAs de plantas.



**Fig.2:** Características estructurales de las proteínas tipo LEA de *E. coli* y levadura comparada con la de las LEAs de plantas y con las proteínas totales de *E. coli* y levadura.

Tabla 2: Relación de hidrofílicas

PROTEÍNA	PERFIL HIDROPÁTICO	% GLY	DÉFICIT HIDRICO	HOMOLOGÍA	
LEA D-19 (Grupo-I)		18.0	+ + +	LEAs Grupo-I	
LEA D-113 (Grupo-IV)		18.2	+ + +	LEAs Grupo-IV	
LEA D-7 (Grupo-III)		8.1	+ + +	LEAs Grupo-III	
DEA D-11 (Grupo II) DEHIDRINAS		13.0	+ + +	LEAs Grupo-II	
LEA-18		12.8	+ + +		
CON6 <i>N. crasa</i> Conidiación		9.7	+ + +	GSIB <i>B.s</i> OSM 8.2 <i>E. c</i> LEAs grupo-I	
CONX <i>N. crasa</i> Conidiación		19.5	+ + +		
GRE1 <i>S. cerevisiae</i>		13.7	+ + +		
STF2 <i>S. cerevisiae</i> Estabilizador ATPasa		112.2	+ + +		
SIP18 <i>S. cerevisiae</i>		12.6	+ + +		
R7E-B <i>S. cerevisiae</i>		10.2	?		Familia L37E de proteínas ribosomales
HSP12 <i>S. cerevisiae</i>		12	+ + +		LEA-76
GSIB <i>B. subtilis</i>		14.7	+ + +	LEAs grupo-I CONX <i>N.c</i> OSM 8.2 <i>E. c</i> GSIB <i>B.s.</i>	
OSM 8.2 <i>E. coli</i>		23	+ + +		
PRTL <i>E. coli</i>		9	+ +	Protaminas	
OSM 8.3 <i>E. coli</i>		10	+ + +		
RMFE <i>E. coli</i> Proteína ribosomal de fase estacionaria		9.1	?		

PLANTAS

HONGOS

BACTERIAS

## 5. Búsqueda de posibles motivos conservados entre las hidrofílicas

A pesar de que no se han descrito dominios conservados entre las LEAs de plantas y otras proteínas dentro y fuera de dicho reino, decidimos buscar motivos en común entre las diversas hidrofílicas partiendo de sus secuencias de aminoácidos. A partir de la secuencia de aminoácidos de cada hidrofílica hicimos rastreo de regiones de homología con el programa "BLASTP" usando el paquete de programas GCG [Devereux, 1984]. Encontramos que existe una elevada homología (47% de identidad y 58% de similaridad a lo largo de la mayor parte de ambas proteínas) entre una proteína LEA de planta del grupo I y la hidrofílica GSIB de *B. subtilis* (Fig. 3A). Estas proteínas están constituidas por sendos dominios muy conservados que se repiten varias veces en cada proteína. Como se puede ver en la Figura 4, el dominio de la proteína LEA y el de la proteína de *B. subtilis* presentan un alto grado de homología. A su vez, las hidrofílicas CON10 de *N. crassa* y Osm8.2 de *E. coli* presentan un grado significativo de homología (47% de identidad en dos fragmentos que representan casi toda la proteína Osm8.2) (Fig. 3B). Estas proteínas también contienen elementos reiterados en su secuencia.

<b>A</b>	GSIB 10	EAGRKGGETTSKNHDKKEYFYQEIGQKGGGEATSKNHDKKEYFYQEIGEKGGGEATSKNHDKKEYFYQ	69
		E KGG+T + E YQEIG KGGEA + E YQE+G KGGEA + E YQ	
	LEA 1:39	EGRSKGGQTRKEQLGHEGYQEIGHKGGEARKEQLGHEGYQEMGHKGGGEARKEQLGHEGYQ	98
<b>B</b>	Osm8.2: 14	DREKASDAGRKGGQHSGGNFKNPQRASEAGKKGQSSGG	53
		D EK + KGG+ S G+F+ ++A EAG+KGG+ SGG	
	Con10: 40	DPEKQREIASKGGKASSGSGFEPGSEKAREAGRKGGKASGG	79
<b>C</b>	GSIB: 32	GQKGGGEATSKNHDKKEYFYQEIGEKGGGEATS	60
		GO + D E +EI KGG+A+S	
	CON10:28	GQASHSGGFASMDPEKQREIASKGGKASS	56
<b>D</b>	GSIB: 4	NKMSREEAGRKGGGETTSKN	22
		N+ +AGRKGG+ + N	
	Osm8.2:14	NREKASDAGRKGGQHSGGN	32
<b>A</b>	GSIB: 70	EIGEKGGGEATSENHDKKEYFYQEIGRKGGEATSKNHDKKEYFYQEIG	112
		E+G KGGEA E E Y+E+GRKGG +T + E +E G	
	LEA 1:99	EMCHKGGEARKEQLGHEGYKEMGRKGGGLSTMEKSGGERAEPEG	141
<b>B</b>	Osm8.2: 5	RGSGNFAEDREKASDAGRKGGQHSGGNFKNPQ	38
		+ SG+F EKA +AGRKGG+ SGG +D +	
	Con10: 53	KASSGSGFEPGSEKAREAGRKGGKASGCTGADDE	86
<b>C</b>	Osm8.2: 3	EHRGSGNFAEDREKASDAGRKGGQHSGGNFKNPQRASEAGKKGQSSGGN	54
		++ G N ++ +A + HSGG DP++ E KGG+ S G+	
	Con10 7	DNPGNFANRPKEEVQAIASKGGQASHSGGFASMDPEKQREIASKGGKASSG	58
<b>B</b>	GSIB: 64	DKEYFYQEIGEKGGGEATS	80
		D E +EI KGG+A+S	
	CON10:40	DPEKQREIASKGGKASS	56
<b>C</b>	GSIB 22	NHDKEYFYQEIGQKGGGEAT	39
		N KE Q I KGG+A+	
	CON10 14	NRFKEEVQAIASKGGQAS	31
<b>B</b>	GSIB: 83	HDKEYFYQEIGRKGGEATSKN	102
		+D + E G+KGG+ + N	
	Osm8.2	NDPQRASEAGKKGQSSGGN	54
<b>C</b>	GSIB 23	HDKEYFYQEIGRKGGEATSKN	42
		+D + E G+KGG+ + N	
	Osm8.2	NDPQRASEAGKKGQSSGGN	54

**Fig.3:** Regiones de homología entre la secuencia de aminoácidos de diferentes hidrofílicas

En todos los elementos reiterados de todas estas hidrofílicas existe un motivo común consistente en el tripéptido KGG (Fig. 4). Esto hace que, a su vez, GSIB presente también un grado de homología con Osm8.2 y con CON10 (Fig3C y 3D). Por ahora desconocemos si la presencia del tripéptido en este grupo de hidrofílicas es significativa.

PROTEÍNA	DOMINIO	REPETICIONES
LEA EM1 (Pl.)	E G Y Q E I G H K G G E A R K E Q L G H	(x 5)
GSIB (Bac.)	E F Y Q E I G Q K G G E A T S K N H D K	(x 5)
CON10 (Hon.)	E K Q R E I A S K G G A S	(x 2)
Osm8.2 (Bac.)	E A G K K G G Q S G G N	(x 2)

**Fig.4:** Consenso de la secuencia de aminoácidos de dominios reiterados dentro de las hidrofílicas. Pl., plantas; Bac., bacterias; Hon., hongos.

Dos de estas proteínas, la LEA de plantas y CON10 de *N. crassa*, se acumulan en cuerpos de resistencia que sobreviven a grados extremos de desecación, y las otras dos se acumulan en microorganismos que requieren aclimatarse a la falta de agua. Es probable que estas hidrofílicas participen en mecanismos comunes de protección frente al estrés osmótico.

### III. DISCUSIÓN: LAS PROTEÍNAS HIDROFÍLICAS EN LA NATURALEZA

Ya hemos mencionado que las características estructurales de las proteínas LEA de plantas y, por tanto, de las hidrofílicas, les confiere más capacidad para interactuar con el agua que a la generalidad de las proteínas. Por ejemplo, se han determinado las propiedades hidrodinámicas de una LEA del grupo I de plantas, la *Em* de maíz, confirmando que un 70% de la proteína es de estructura aleatoria y, por lo tanto, es altamente hidratable [McCubbin y Kay, 1985]. Se cree que esta propiedad física debe estar relacionada con su función, en tanto que faciliten la retención de agua en células que sufren estrés osmótico, e impidan la deshidratación completa de las semillas, esporas u otros cuerpos de resistencia. Podrían además evitar la cristalización de componentes celulares en condiciones de deshidratación severa [Ingram y Bartels, 1996]. Por ejemplo las LEAs del grupo 1 y 4 podrían estar implicadas en la solvatación de estructuras citosólicas a través de sus amplios dominios de estructura abierta [Baker et al., 1988]. Estableciendo un paralelismo con los azúcares solubles, las regiones abiertas de las LEAs exponen numerosos grupos hidroxilados, de gran capacidad de solvatación. Estas regiones de estructura aleatoria les podría permitir "amoldarse" a la superficie de estructuras celulares, sustituyendo al agua en sus interacciones a través de puentes de hidrógeno, de forma equivalente al mecanismo que se le ha adjudicado a los disacáridos como estabilizadores en condiciones de desecación extrema (ver introducción de este capítulo). Las hidrofílicas podrían también estabilizar un sistema a través del mecanismo de exclusión molecular que se le ha adjudicado a los osmolitos compatibles.

También se ha propuesto que algunos tipos de proteínas LEA pudieran ser atrapadores de iones. Durante el estrés osmótico, la salida de agua de las células aumenta la concentración de los iones intracelulares, lo que los convierte en tóxicos. En el caso de las LEAs del grupo 4, se ha encontrado que una región importante de la  $\alpha$ -hélice gigante posee una distribución preferencial de cargas (+) y (-) hacia lados opuestos de la hélice, lo que podría generar campos eléctricos que atraparían iones [Imai et al., 1996]. Las LEAs del grupo 3 poseen residuos en sus  $\alpha$ -hélices anfífilas (gln3, glu7, lys8 y glu11) que, de estar formando puentes salinos con otra hélice anfipática, podrían pasar a formar puentes salinos con iones del medio cuando dichos iones rebasen una concentración crítica durante la deshidratación [Dure III, 1993].

Walters et al., (1997) encuentran que en semillas de trigo las proteínas que permanecen solubles tras el hervor (principalmente LEAs) poseen azúcares fuertemente unidos y que dichos complejos tienen propiedades

de hidratación especiales. Ellos proponen que estas proteínas sirven como amortiguadores de la hidratación.

A través de los mecanismos moleculares mencionados u otros desconocidos, las hidrofilinas operan probablemente como chaperonas moleculares que estabilizan preferencialmente a las proteínas u otras biomoléculas en condiciones de baja disponibilidad de agua. La presencia comprobada de las proteínas LEA y de PvLEA-18 en numerosos, si no todos, los tipos celulares del embrión y en muchos tipos celulares de tejidos vegetativos estresados, además de su acumulación en diversos compartimentos celulares, confirman que su función se ejerce de forma muy generalizada, lo que apoya la idea de una función de protección general. Así, el hecho de que una de nuestras hidrofilinas, PRTL (protamine-like) sea muy parecida a proteínas que probablemente protegen al ADN [Altman et al., 1981], otra de ellas, STF2, sea una proteína que estabiliza la interacción de otras dos proteínas [Yoshida et al., 1990], y ambas operen en condiciones de estrés, nos hace pensar que este tipo de moléculas, probablemente a través de mecanismos moleculares similares, son capaces de proteger o estabilizar moléculas de naturaleza muy variada.

#### IV. BIBLIOGRAFÍA

- Altman, S., Model, P., Dixon, G.H., and Wosnick, M.A.**(1981). An *E. coli* gene coding for a protamine-like protein. *Cell* **26**: 299-304.
- Arakawa, T., and Timasheff, S.N.** (1982). Preferential interaction of proteins with salts in concentrated solutions. *Biochemistry* **21**: 6545-6552.
- Babychuck, E., Kushnir, S., Belles-Boix, E., Van Montagu, M., and Inzé, D.** (1995). *Arabidopsis thaliana* NADPH oxidoreductase homologs confer tolerance of yeasts toward the thiol-oxidizing drug diamide. *J. Biol. Chem.* **270**: 26224-26231.
- Baker, J., Steele, C., and Dure III, L.** (1988). Sequence and characterization of 6 *Lea* proteins and their genes from cotton. *Plant Mol. Biol.* **11**: 277-291.
- Crowe, J.H., Carpenter, J.F., Crowe, L.M., and Anchordoguy, T.J.**(1990). Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. *Cryobiology* **27**: 219-231.
- Devereux, J., Haerberli, P., and Smithies, O.** (1984). A comprehensive set of sequence analysis programs for the vax. *Nucleic Acid Res.* **12**: 387-395.
- Dure III, L.** (1993). A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. *Plant J.* **3**: 363-69.
- Gould, G.W.** (1986). Water and the survival of bacterial spores. In A. V. Leopold, Eds. (Ithaca, Cornell University Press). pp. 143-156.
- Imai, R., and al., e.** (1996). A *lea*-class gene of tomato confers salt and freezing tolerance when overexpressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **170**: 243-248.
- Ingram, J., and Bartels, D.** (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**: 377-403.
- Knoll, H.R., and Walsh, J.L.** (1992). Association of glycolytic enzymes with the cytoskeleton. *Current Topics in Cellular regulation* **33**: 15-30.
- Koster, K.L.** (1991). Glass formation and desiccation tolerance in seeds. *Plant Physiol.* **96**: 302-304.
- Lee, G.J., Roseman, A.M., Saibil, H.R., and Vierling, E.** (1997). A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state. *EMBO J.* **16**: 659-671.
- Leopold, A.C.** (1990). Coping with desiccation. In *Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms*. R. G. Alscher and J. R. Cumming, Eds. (New York, Wiley-Liss). pp. 37-56.
- McCubbin, W.D., and Kay, C.M.** (1985). Hydrodynamics and optical properties of the wheat *Em* protein. *Can. J. Biochem.* **63**: 803-810.

- Mehlen, P., Kretz-Remy, C., Prévaille, X., and Arrigo, A.P. (1996).** Human hsp27, *Drosophila* hsp27 and human  $\alpha$ B-crystallin expression-mediated increase in glutathione is essential for the protective activities of these proteins against TNF $\alpha$ -induced cell death. *EMBO J.* **15**: 2695-2706.
- Prakash, V., Loucheux, C., Scheuffeld., Gorbunoff, M.J., and Timasheff, S.N. (1981).** Interaction of proteins with solvent components in 8M urea. *Arch. Biochem. Biophys.* **210**: 455-464.
- Roberts, A.N., Berlin, V., Hager, K.M., and Yanofski, C. (1988).** Molecular analysis of a *Neurospora crassa* gene expressed during conidiation. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 2411-2418.
- Völker, U., Egelmann, S., Maul, B., Riethdorf, S., Völker, A., Schmid, R., Mach, H., and Hecker, M. (1994).** Analysis of the induction of general stress proteins of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **140**: 741-752.
- Waters, R.E. (1995).** The molecular evolution of the small-heat shock proteins in plants. *Genetics* **141**: 785-795.
- White, B.T., and Yanofsky, C. (1993).** *Dev. Biol.* **160**: 254-264.
- Williams, R.J., and Leopold, A.C. (1989).** The glassy state in corn embryos. *Plant Physiol* **89**: 977-981.
- Wistow, G., Richardson, J., Jaworski, C., Graham, C., Sharon-Friling, R., and Segovia, L. (1994).** Crystallins: the over-expression of functional enzymes and stress proteins in the eye lens. *Biotechnology and genetic engineering reviews* **12**: 1-38.
- Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, P.D., and Somero, G.N. (1982).** Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217**: 1214-1217.
- Yoshida, Y., Sato, T., Hashimoto, T., Ichikawa, N., Nakai, S., Yoshikawa, H., Imamoto, F., and Tagawa, K. (1990).** Isolation of a gene for a regulatory 15-KDa subunit of mitochondrial F1-F0-ATPase and construction of mutant yeast lacking the protein. *FEBS Lett.* **192**: 49-53.

## CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

A lo largo de todo este trabajo hemos descrito la caracterización de un grupo de genes de *P. vulgaris* que responden a déficit hídrico. De ellos, tres genes codifican para proteínas que son secretadas a la pared celular: dos proteínas ricas en prolina (PvPRP-12 y PvPRP2-37) y una transferasa de lípidos (PvLTP-24), cuyas funciones precisas en la adaptación de los tejidos vegetales a la deshidratación no han sido aún establecidas. Sin embargo, los conocimientos acumulados sobre la naturaleza de dichas proteínas y su comportamiento durante el desarrollo de las plantas o su respuesta a factores medioambientales nos ha permitido sugerir que participan en modificaciones de la pared celular encaminadas a aumentar su resistencia mecánica, su resistencia frente a la penetración de patógenos y su resistencia frente a la pérdida de agua. En el caso de las PRPs, su papel adaptativo frente al déficit hídrico está mucho menos explorado que el de las LTPs, por lo que en el laboratorio se ha continuado su caracterización en colaboración con la Dra Gladys Casaab, con quien se está analizando las variaciones en cantidad y en solubilidad de las PRPs durante el estrés. Otro foco de interés tradicional en el laboratorio que ha redirigido nuestra atención a las PRPs es su posible participación en el proceso de transducción de información celular a través de los mecanismos de anexión entre la pared celular y la membrana plasmática. Recientemente se ha encontrado que una proteína de pared celular de *P. vulgaris* caracterizada en el laboratorio, que se acumula en respuesta a déficit hídrico y que promueve procesos de adhesión celular *in vitro*, cruza antigénicamente con un anticuerpo que reconoce a la familia PRP2 de plantas, y cuyo representante en frijol es el producto del gen PvPRP2-37.

Los otros genes, cuya expresión ha sido descrita en esta tesis, codifican para proteínas que han sido implicadas en la estabilización de proteínas y estructuras celulares durante el estrés. Se trata de la proteína de choque térmico de bajo peso molecular (PvHSP17-19) y de las proteínas de embriogénesis tardía (PvLEAIV-25 y PvLEA-18). Tampoco en estos casos se conoce el modo de acción de las proteínas o las funciones que realizan para aumentar la tolerancia de la célula vegetal a la deshidratación. Para el caso de las lmw-HSPs, la evidencia obtenida *in-vitro* e *in-vivo* sugieren que esta familia de proteínas funciona en las células eucariotas como surfactantes y estabilizadores de proteínas y que esta podría ser al menos una de sus funciones adaptativas en condiciones de baja disponibilidad de agua. La mayor parte de nuestro interés se ha enfocado en uno de los grupos de proteínas de plantas que quizás ha sido más citado en la bibliografía, pero que, al mismo tiempo sigue siendo el gran desconocido de la respuesta a estrés osmótico en las

plantas: las proteínas LEA. Aparte de un miembro de una familia conocida de LEAs, hemos descrito la expresión de de un gen que hemos podido clasificar como componente de una nueva familia de genes *lea* de plantas: *Pvlea-18*. Además de describir su respuesta al déficit hídrico, hemos encontrado que juega un papel en tejidos vegetales de plántulas no sometidas a estrés medioambiental. La presencia en estos tejidos está relacionada con una alta acumulación de osmolitos, ya sea por su involucramiento en procesos de expansión celular o en procesos metabólicos. La proteína se asegura su presencia en dichos tejidos a través de la activación del gen en la región de elongación del hipocotilo y a través de un mecanismo de regulación postranscripcional que probablemente determina un incremento de su estabilidad. Pensamos que esto está relacionado con una interacción estable de PvLEA-18 con carbohidratos solubles, según se deriva de resultados recientes obtenidos en el laboratorio. Estamos interesados en completar esta caracterización y en probar las propiedades protectoras *in-vitro* de PvLEA-18 sobre la estabilidad de enzimas en ambientes de baja disponibilidad de agua.

Finalmente hemos podido establecer que la acumulación de proteínas muy hidrofílicas ricas en glicinas en procesos de aclimatación al estrés osmótico es un mecanismo adaptativo que ocurre en una diversidad de organismos muy distanciados filogenéticamente, y a las proteínas que cumplen estas propiedades las hemos llamado hidrofílicas. Por ahora desconocemos la función de este tipo de proteínas, aunque pensamos que cumplen funciones variadas relacionadas con la estabilización de proteínas y estructuras celulares así como con la protección de ácidos nucleicos. La identificación de este tipo de proteínas fuera de las plantas abre un campo de investigación con muchos abordajes, aunque nuestro principal interés se centra en demostrar que juegan un papel adaptativo en ambientes con baja disponibilidad de agua y en aproximarnos a sus funciones de manera más precisa.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA